

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

**BAKTERIOCINI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U
PREVENCIJI I LIJEČENJU MASTITISA**

DIPLOMSKI RAD

Andreja Grgić

Zagreb, rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

BAKTERIOCINI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PREVENCIJI I LIJEČENJU MASTITISA

DIPLOMSKI RAD

Andreja Grgić

Mentor: prof. dr. sc. Dubravka Samaržija

Neposredni voditelj: dr. sc. Darija Bendelja Ljoljić

Zagreb, rujan, 2019.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Andreja Grgić**, JMBAG 0253032070, rođena 26.05.1993. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

BAKTERIOCINI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PREVENCIJI I LIJEČENJU MASTITISA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Andreje Grgić**, JMBAG 0253032070, naslova

BAKTERIOCINI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PREVENCIJI I LIJEČENJU MASTITISA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

- | | | | |
|----|-----------------------------------|---------------------|-------|
| 1. | prof. dr. sc. Dubravka Samaržija | mentor | _____ |
| 2. | dr. sc. Darija Bendelja Ljoljić | neposredni voditelj | _____ |
| 3. | doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar | član | _____ |
| 4. | izv. prof. dr. sc. Antun Kostelić | član | _____ |

Zahvala

Ovim se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Dubravki Samaržiji koja je prihvatila moj zahtjev za mentorstvo i uputila me u temu i pisanje diplomskog rada. Isto tako, zahvaljujem se dr. sc. Dariji Bendelja Ljoljić na velikoj pomoći i savjetima tijekom pisanja ovog rada.

Veliku zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima Blažu i Ani te bratu Iliji, koji su uvijek bili uz mene bez obzira da li se radilo o teškim ili sretnim trenucima i bez kojih ovo sve što sam postigla ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem se svome mužu Stjepanu na ljubavi, podršci i poticanju tijekom mog studiranja.

Hvala mojoj cimerici Ani koja je uvijek bila uz mene kroz studentske dane i učinila ih zabavnim i zbog koje ću se rado sjećati Zagreba i dana provedenih u njemu.

I na kraju želim se zahvaliti svim svojim prijateljima i prijateljicama, koji su mi vrijeme provedeno na fakultetu uljepšali svojim prisustvom i pomogli da to vrijeme smatram najljepšim razdobljem svoga života.

SADRŽAJ

Sažetak.....	
Summary.....	
1. Uvod.....	1
1.1. Cilj rada.....	2
2. Mastitis	3
2.1. Podjela mastitisa.....	4
2.1.1. Subklinički mastitis.....	4
2.1.2. Klinički mastitis	6
2.2. Najčešći uzročnici mastitisa.....	6
2.2.1. Bakterija <i>Staphylococcus aureus</i>	8
2.2.2. Bakterija <i>Streptococcus agalactiae</i>	9
2.2.3. Bakterija <i>Mycoplasma bovis</i>	10
2.2.4. Okolišni (uvjetovani) uzročnici mastitisa	12
2.3. Rezistencija bakterija prema antibioticima	13
2.4. Liječenje.....	15
2.5. Ekonomski gubitci uslijedi pojave mastitisa	16
3. Bakteriocini	17
3.1. Klasifikacija bakteriocina BMK.....	21
3.2. Nizini.....	23
3.3. Lakticini.....	26
3.4. Aureocini.....	28
4. Bakteriocini u prevenciji i liječenju mastitisa	30
5. Zaključak	40
6. Literatura	41
Životopis.....	47

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Andreje Grgić**, naslova

BAKTERIOCINI BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U PREVENCIJI I LIJEČENJU MASTITISA

Mastitis je najčešća i najskuplja bolest mliječnih krava. Procjenjuje se da od ukupnog broja muznih krava njih približno jedna trećina pati od infektivne upale vimena. U najvećem je broju slučajeva mastitis posljedica galaktogene penetracije patogenih bakterija u vime životinje. Najčešći uzročnici mastitisa u mliječnim krava su: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis*. Međutim, danas je uspjeh liječenja mastitisa antibioticima ograničen budući da je većina tih bakterijskih vrsta postala rezistentna na antibiotike. Stoga su bakteriocini bakterija mliječne kiseline koji imaju visoki antibakterijski potencijal prema brojnim patogenim bakterijama i pri tom ne stvaraju rezistentnost, postali predmetom intenzivnih istraživanja u prevenciji i liječenju mastitisa. Djelotvorni bakteriocini u prevenciji i liječenju mastitisa razni su oblici nizina, lakticina i aureocina. Bakteriocini djeluju brzo na osjetljive organizme staničnom lizom te na taj način sprječavaju da ne dođe do razvoja rezistencije kod patogena. Bakteriocini u liječenju mastitisa mogu djelovati samostalno ili u sinergiji s drugim bakteriocinima ili antibioticima.

Ključne riječi: *mastitis, patogene bakterije, bakterije mliječne kiseline, antibiotici, bakteriocini.*

Summary

Of the master's thesis – student **Andreja Grgić**, entitled

BACTERIOCINS PRODUCED BY LACTIC ACID BACTERIA ASSOCIATED WITH THE PREVENTION AND TREATMENT OF BOVINE MASTITIS

Mastitis is the most common and most expensive disease in dairy farming. It is estimated that one third of dairy cows suffer from infectious udder inflammation. In most cases, mastitis is a consequence of penetration of galactogenic pathogenic bacteria into the udder of the animal. The most common causes of mastitis in dairy cows are: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. However, it has been harder to treat mastitis due to the emergence of antibiotic resistance in pathogens. Therefore, lactic acid bacteriocins, which have high antibacterial potential against many pathogenic bacteria and do not create antibiotic resistance, have become the subject of intense research in the prevention and treatment of mastitis. The most effective bacteriocins in prevention and treatment of mastitis are various forms of nisin, lacticin and aureocin. Bacteriocins act rapidly on susceptible organisms by cell lysis and with this rapid action could ensure that resistance is less likely to develop by pathogens. Bacteriocins can act independently or in a synergy with other bacteriocins or antibiotics when used in the treatment of mastitis.

Keywords: *mastitis, pathogenic bacteria, lactic acid bacteria, antibiotics, bacteriocins.*

1. Uvod

Mastitis, odnosno upala mliječne žlijezde, jedna je od najskupljih bolesti u intenzivnoj proizvodnji kravljeg mlijeka. Mastitis nastaje uslijedi štetnog djelovanja bakterija na mliječnu žlijezdu. Tijekom mastitisa dolazi do fizikalnih, kemijskih ili bakterioloških promjena u mlijeku i vimenu životinje.

Prilikom liječenja krava potrebno je prvo na osnovu uočenih simptoma, a kasnije nakon mikrobiološke pretrage vimena odrediti tip mastitisa da bi se mogla odrediti odgovarajuća terapija. Liječenje bi trebalo ukloniti bakterije uzročnike mastitisa iz vimena, ali danas u praksi to postaje sve teže zbog pojave rezistentnosti bakterija na antibiotike. Otpornost bakterija na lijekove uzrokovana je prekomjernom upotrebom antibiotika u liječenju mastitisa bez određivanja antibiograma. Stoga se javila potreba za istraživanjima u području primjene novih antimikrobnih tvari u liječenju ljudi i životinja bez narušavanja njihovog zdravlja.

Zbog antibakterijskih svojstava, u novije se vrijeme istražuje djelovanje bakteriocina u prevenciji i liječenju mastitisa mliječnih krava. Bakteriocini su ribosomalno sintetizirani antimikrobni peptidi koji imaju antibiotska svojstva, iako po prirodi nisu antibiotici. To su tvari bez boje, okusa i mirisa sa širokim pH rasponom djelovanja. Proizvod su mnogih bakterija, a podložni su djelovanju proteolitičkih enzima te se ne zadržavaju dugo u organizmu, odnosno nemaju toksičan učinak na humani organizam (Perez i sur., 2014.). Mogu imati bakteriostatsko ili baktericidno djelovanje koje je najčešće usmjereno na srodne bakterijske vrste ili sojeve iste vrste. Bakterije koje ih sintetiziraju posjeduju specifične imunosne sustave koji ih štite od djelovanja vlastitih bakteriocina. Njihova prednost pred antibioticima ogleda se u činjenici da su to peptidi koji nastaju jednostavnom biosintezom tijekom primarne faze rasta bakterija dok su antibiotici sekundarni metaboliti.

Razvojem znanosti i tehnologije intenziviraju se istraživanja na temu djelovanja bakteriocina, kvantitete i kvalitete bakteriocina i otkrića novih bakteriocina. Ekonomske implikacije mastitisa kao najčešće bolesti na mliječnim farmama garancija su za daljnja istraživanja s ciljem razvoja novih tehnologija kod antimikrobne terapije. Bakteriocini se smatraju alternativom koja uistinu nudi prednosti ispred konvencionalne terapije antibioticima. Zbog povećane zabrinutosti za ljudsko zdravlje, primarno zbog pojave

antibiotske rezistencije kod patogenih bakterija dodatno se potiče razvoj alternativnih antiinfektivnih tvari.

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada je kritički usporediti dosadašnje rezultate istraživanja o učinku različitih vrsta bakteriocina koje tvore bakterije mliječne kiseline na četiri najčešća uzročnika mastitisa u mliječnim krava: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis*.

2. Mastitis

Mastitis ili upala mliječne žlijezde najčešće je infektivno oboljenje mliječnih krava, a nastaje djelovanjem različitih mikroorganizama, najčešće patogenih bakterija na mliječnu žlijezdu domaćih životinja. Pojavljuje se uslijed različitih kemijskih, toplinskih ili mehaničkih ozljeda tkiva vimena, i česta je bolest mliječnih goveda (Havranek i Rupić, 2003.).

Upala vimena nastaje uslijed stalne borbe između obrambenog sustava životinje i bakterija koje se žele naseliti unutar vimena. Mnogi čimbenici poput oblika i veličine vimena i sisa, ozljede na koži sisa i vimena, higijene, načina i redovitosti mužnje te higijenskih uvjeti u kojima životinja živi mogu utjecati na razvoj infekcije ili očuvanje zdravlja vimena (Bačić, 2009.).

Kravlje vime sastoji se od četiri odvojene sekretorne žlijezde razdvojene suspenzornim ligamentima koji, osim funkcije razdvajanja, podržavaju i veliku težinu vimena. Mlijeko u vimenu ne može prelaziti iz jedne četvrti u drugu, kao ni mikroorganizmi koji su prirodno prisutni u pojedinoj četvrti. Stoga, mastitis može biti prisutan u samo jednoj četvrti, a ostale tri četvrti mogu biti zdrave. Snažni suspenzorni ligamenti su od velike važnosti za higijenu vimena jer je ono tada smješteno više, te je istodobno i čišće. Bolja higijena vimena znači i manji rizik za nastanak mastitisa (Bačić, 2009.).

U 95% slučajeva bakterije ulaze u mliječnu žlijezdu kroz sisni kanal, a znatno rjeđe preko kože, krvi ili limfe. Najčešće se javlja kao zasebna bolest, ali i kao popratni simptom nekih zaraznih bolesti poput bruceloze (Kostelić, 2015.). Također, odražava se kroz fizikalne, kemijske i bakteriološke promjene u mlijeku i parenhimu vimena (Radostits i sur., 2000.). Sekretorno tkivo, koje je funkcionalni dio vimena, može biti trajno oštećeno uslijed mastitisa (Bačić, 2009.). Najrizičnije razdoblje za pojavu infekcije vimena je na kraju laktacije ili neposredno prije početka laktacije (Giesecke i sur., 1994.). Mlijeko iz upaljenog vimena sadrži patogene mikroorganizme koji u vime dospijevaju na različite načine i njihove toksine. Najčešći načini prijenosa uzročnika bolesti u zdravo vime su dodir s podom i steljom gdje se nalazi mnoštvo mikroorganizama, putem insekata (muha, obada) te utjecajem čovjeka zbog loše higijene vimena prije i tijekom mužnje. Također, ozljede kože sisa i vimena otvaraju put mikroorganizmima koji ulaze u unutrašnjost vimena i uzrokuju mastitis (Havranek i Rupić, 2003.).

Prema Havranek i Rupiću (2003.), upale vimena stvaraju velike štete u govedarskoj proizvodnji te industriji mlijeka i mliječnih prerađevina. Štete se očituju smanjenom proizvodnjom mlijeka u vimenu, prijevremenim izlučenjem krava iz uzgoja zbog propadanja četvrti vimena, naglim uginućem i klanjem iz nužde oboljelih krava. U liječenju upale vimena koriste se visoke doze antibiotika s dugotrajnom karencom te je u tom razdoblju mlijeko neupotrebljivo za prehranu i preradu i štetno je za zdravlje ljudi.

2.1. Podjela mastitisa

Najučestaliji oblik mastitisa je subklinički, koji je skriven, dok je klinički mastitis vidljiv i nije toliko čest na farmama mliječnih krava. Smatra se da je u 90 – 95% slučajeva mastitisa prisutna subklinička upala vimena. Subklinički mastitis je opasniji i uzrokuje veće štete od kliničkog mastitisa (Havranek i Rupiće, 2003.).

Dvije su osnovne podjele mastitisa:

1. Na osnovi kliničke slike i jačine simptoma
2. Na osnovi etiologije i epidemiologije razvoja infekcije (Bačić, 2009.).

Osim same bolesti koja uzrokuje izravne ekonomske gubitke u proizvodnji, ne smiju se zanemariti ni nedostaci na farmama koji su povezani uz nastanak mastitisa: metabolički poremećaji, pogrešna hranidba, neadekvatan smještaj i higijena, neadekvatna mužnja, te nepravilna i neredovita njega papaka (Bačić, 2009.).

Na osnovu kliničke slike postoje:

1. Subklinički mastitis
2. Klinički mastitis

2.1.1. Subklinički mastitis

Subklinički mastitis je upala bez vidljivih znakova bolesti, vime krave izgleda normalno, a mlijeko je nepromijenjeno. Za postavljanje dijagnoze potrebno je provođenje

dijagnostičkih testova kao što su određivanje broja somatskih stanica ili mastitis test. Mastitis test je brza i jednostavna orijentacijska metoda za određivanje subkliničkog mastitisa koji sadrži površinski aktivnu tvar i pH indikator. Tim testom se otkriva je li četvrt vimena inficirana, no ne i koji je uzročnik infekcije. Ako se prilikom reakcije pojavljuje mnoštvo krpičastih tvorbi u mlijeku ili zgrušavanje poput bjelanjka i promjena boje u ljubičasto, znači da životinja ima subklinički mastitis. Da bi se odredio uzročnik mastitisa potrebno je pozitivne uzorke mlijeka poslati na mikrobiološku analizu (Bačić, 2009.).

Subklinički oblik može u razdoblju od nekoliko sati prijeći u klinički oblik. Razvoj bolesti može potrajati nekoliko dana, tjedana ili mjeseci, a može se dogoditi i spontano samoizlječenje. Ovisno o uzročniku, subklinički mastitis se javlja u stadima 2 – 20 puta češće nego klinički oblik, te je njihovo pravovremeno otkrivanje bitan čimbenik u prevenciji nastanka i širenja infekcije (Bačić, 2009.). Subklinički mastitis je najraširenija bolest u proizvodnji kravljeg mlijeka, a utvrđeno je da se na svaki klinički slučaj pojavljuje 15 do 40 subkliničkih (Kelly 2002.).

Oblici subkliničkog mastitisa su:

- a) Poremećena sekrecija – iz mlijeka se ne može izolirati uzročnik, povećan je broj somatskih stanica, vime nije inficirano, a mlijeko je slankastog okusa.
- b) Latentna infekcija – uzročnik je izoliran, povećan je broj somatskih stanica, a mlijeko je slankasto.
- c) Kronično-kataralni mastitis – upala na epitelu cisterni, alveola i kanalića (Čačić i sur., 2003.).

Vrlo često subklinički mastitis prelazi u kroničan proces (dugotrajan, kada traje duže od 2 tjedna), a može trajati i kroz cijelu laktaciju. Dijagnoza mastitisa uglavnom se postavlja prema broju somatskih stanica (BSS) u mlijeku i kada njihov broj prelazi 280 000 u 1 mL mlijeka, s 80%-tnom sigurnošću može se utvrditi da životinja ima subklinički mastitis (Štoković i sur., 2014.).

2.1.2. Klinički mastitis

Klinički mastitis može se prepoznati po vidljivim promjenama u mlijeku, poput krpičastih i vlaknastih tvorbi koje čine nakupine odumrlog epitela, leukocita i bjelančevina. Vime može izgledati normalno ili otečeno i bolno (Bačić, 2009.).

Klinički mastitis se prema jačini simptoma dijeli na blagi, umjereni i jaki oblik. Blagi oblik kliničkog mastitisa (subakutni mastitis) često prolazi nezapaženo na farmama gdje se ne provodi redoviti pregled broja somatskih stanica i mastitis test. Ovaj oblik kliničkog mastitisa može se otkriti pri kontroli vimena mastitis testom kada su u mlijeku vidljive krpice i prije dodavanja reagensa. Umjereni oblik kliničkog mastitisa prepoznaje se po vidljivo upaljenom vimenu (crveno, temperirano, tvrdo, bolno) što je uzrokovano krpicama prisutnim u mlijeku. One blokiraju mliječne kanaliće i sprječavaju izlazak mlijeka iz alveola te se alveole povećavaju, a proizvodnja mlijeka smanjuje. Upalu vimena pojačava dotok krvi i tjelesnih tekućina. Na mjestu upale se nalazi upalni edem koji, također, uzrokuje povećanje obujma vimena. Teški oblik kliničkog mastitisa naziva se još toksični mastitis ili endotoksični šok jer simptome uzrokuju endotoksini koje stvaraju bakterije za vrijeme infekcije vimena. Ovaj oblik kliničkog mastitisa pored promjene konzistencije mlijeka i vidljivo upaljenog vimena uzrokuje i poremećaj općeg stanja krave sa simptomima potištenosti, upale očiju, hladnih ušiju, slabosti i depresije (Bačić, 2009.).

Perakutni mastitis je vrlo težak oblik kliničkog mastitisa, brzog razvoja simptoma te mogućnosti uginuća krave. Krava se može potpuno oporaviti od kliničkog mastitisa, ali može doći i do kroničnog mastitisa ako nije došlo do bakteriološkog izlječenja (Bačić, 2009.).

2.2. Najčešći uzročnici mastitisa

Mikroorganizmi su najčešći uzročnici mastitisa u životinja. U uzročnike mastitisa ubrajamo različite mikroorganizme poput aerobnih i anaerobnih bakterija, mikoplazmi, kvasaca i plijesni. Postoji više čimbenika koji određuju potencijalnog uzročnika mastitisa; ponajprije je to opća otpornost životinje, zatim vrsta i patogenost mikroorganizma, infekcijska doza i uvjeti držanja muznih životinja. Najčešći uzročnici mastitisa u mliječnim

krava su bakterije roda *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli* i drugi koliformni mikroorganizmi (Bačić, 2009.).

U Republici Hrvatskoj je 2015. godine provedeno istraživanje čiji je cilj bio utvrditi učestalost pojedinih mikroorganizama uzročnika mastitisa u vimenu krava te provesti njihovu identifikaciju. Mikrobiološkom pretragom utvrđeno je 767 uzoraka sekreta vimena iz 11 županija i grada Zagreba pozitivnih na mastitis. Pritom je izdvojeno više desetaka različitih vrsta bakterija i patogenih kvasaca koji mogu prouzročiti mastitis. Najčešći uzročnici mastitisa su bile vrste *Streptococcus uberis* (28,8%), zatim *Staphylococcus aureus* (15,5%), *Streptococcus* spp. (13,8%), *Corynebacterium* spp. (8,6%), *Enterococcus* spp. (5,9%), *Trueperella pyogenes* (5,1%), *Staphylococcus* spp. (4,8%), *Escherichia coli* (4,4%), patogeni kvasci (3,3%), *Streptococcus dysgalactiae* (2,1%), *Pasteurella* spp. (2%). Ostali uzročnici izdvojeni su u manjem postotku (Cvetnić i sur., 2016.).

Većina uzročnika mastitisa je ubikvitarna, pa se bolest može držati pod kontrolom, ali ne i iskorijeniti. Mikroorganizmi u vime ulaze kroz sisni kanal, preko povreda na koži ili krvlju. Ulaskom u vime, razmnožavaju se u alveolama, a njihovi toksini oštećuju epitelne sekretorne stanice, odnosno uzrokuju mastitis. U pogodovne čimbenike za upalu vimena ubrajamo: nepravilnu i neredovitu mužnju, kvarove muznih uređaja, lošu higijenu mužnje, krave i staje, nedostatnu hranidbu i niz drugih čimbenika. Mužnja je jedan od glavnih pogodovnih čimbenika nastanka mastitisa. Ako je prekratka, u vimenu zaostaje rezidualno mlijeko i može uzrokovati upalu vimena, a ako je mužnja preduga može doći do povećanja broja somatskih stanica uslijed oštećenja epitela alveola i sluznice cisterne bez djelovanja mikroorganizama (Havranek i Rupić, 2003.).

Prema epidemiologiji uzročnika (Bačić, 2009.), mastitis može biti:

- Kontagiozni (zarazni)
- Uvjetovani (okolišni)

U nastavku teksta bit će opisani najčešći uzročnici mastitisa u suvremenoj proizvodnji kravljeg mlijeka.

2.2.1. Bakterija *Staphylococcus aureus*

Bakterija *Staphylococcus aureus* (slika 2.1.) okruglog je oblika grupiranog u „grozdove“. Široko je rasprostranjena u prirodi, a najčešće se nalazi na koži i u nosu ljudi i sisavaca. To je gram-pozitivna, patogena, asporogena i koagulaza pozitivna bakterija kojoj je za rast pogodan raspon temperature 7 – 48 °C i pH vrijednosti 4 – 10. Pripada skupini fakultativnih anaerobnih mikroorganizama i ima mogućnost stvaranja različitih toksina, što ju čini relativno otpornom bakterijom (Samaržija, 2017.).

Bakterija *Staphylococcus aureus* je najčešći uzročnik mastitisa. Tijekom infekcije četvrti tom vrstom nastaju najveći ekonomski gubici u mljekarskoj industriji, jer inficirana četvrt izlučuje i do 50% manje mlijeka od zdrave četvrti. *Staphylococcus aureus* najčešće uzrokuje kroničnu infekciju koju je teško izliječiti, no mjere kontrole i preventive mogu smanjiti učestalost infekcije (Bačić, 2009.).



Slika 2.1. Bakterija *Staphylococcus aureus*

(Izvor: <http://pinnaclehealthradio.org/staphylococcus-aureus-scam-nigeria-uk-based-physician-cries>)

Posljednjih desetak godina bakterija *S. aureus* je najčešće izolirani uzročnik subkliničkog i kliničkog mastitisa muznih životinja (30 – 40%). Zbog toga, ta patogena bakterija u današnjim uvjetima proizvodnje često kontaminira sirovo mlijeko. Istovremeno, broj rezistentnih sojeva na primjenu antibiotika u liječenju mastitisa povećao se na približno 70%. Uzročno-posljedično tome mlijeko infektivnog vimena može sadržavati i do 10^8 cfu mL⁻¹ te bakterije (Samaržija, 2017.). *S. aureus* je globalno jedan od najvažnijih uzročnika

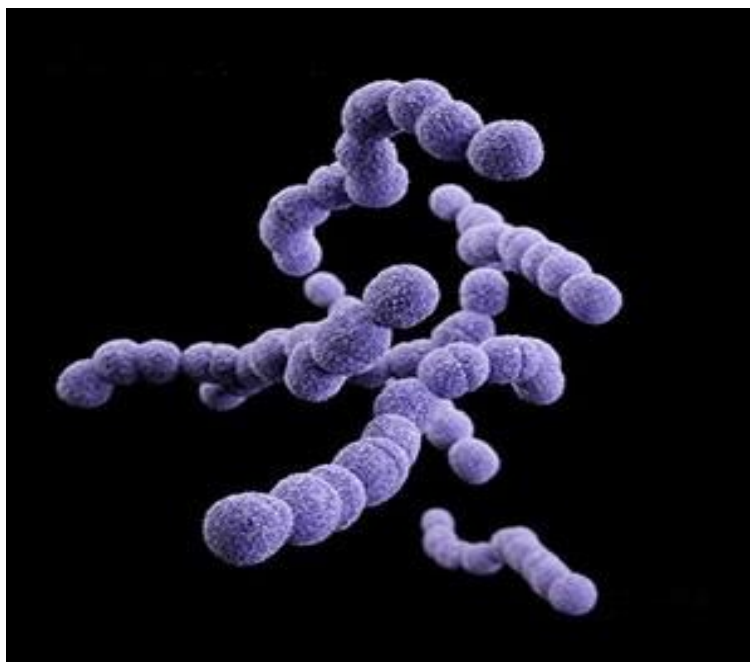
kontagioznih mastitisa u goveda. U ranijim istraživanjima kod nas i drugdje u svijetu bio je najčešći uzročnik mastitisa (Pavlak i sur., 2008.; Maćešić, 2010.).

Infekcija bakterijom *Staphylococcus aureus* javlja se u svim stadijima laktacije, pa su tako junice u nekim stadima zaražene već i prije početka prve laktacije. Inficirana mliječna žlijezda najčešći je izvor i rezervoar infekcije, jer bakterije obitavaju i unutar tijela i na tijelu krave. Bakterije se brzo razmnožavaju na koži sisa i vimena i lako se vežu na sluznicu sisnog kanala i sisne cisterne (Pavlak i sur., 2008.; Maćešić, 2010.). Prema Bačić (2009.) bakterija *S. aureus* ima sposobnost izbjegavanja fagocitoze stvaranjem polisaharida koji oko sebe sadrži sluz i tako sprječava prepoznavanje i fagocitozu te se može umnažati unutar fagocita, koje koristi kao transportno sredstvo za odlazak dublje u parenhim vimena.

Veći dio stada može biti inficiran bez vidljivih kliničkih znakova infekcije. Broj somatskih stanica je nizak na početku infekcije (< 200 000), a ako infekcija potraje onda broj somatskih stanica varira između 200 000 i 800 000. Infekcija uzrokuje nastanak malih apscesa u parenhimu vimena. Nastala vezivno tkivna čahura apscesa štiti uzročnika od djelovanja antibiotika, te se privremeno smanjuje broj bakterija i leukocita u uzorku mlijeka za bakteriološku analizu. Ako apsces pukne povećava se broj somatskih stanica i bakterija u mlijeku i manifestira se klinički ili subklinički mastitis. Bakterijska vrsta *S. aureus* stvara različite toksine koji mogu uzrokovati bolest kod ljudi prilikom konzumacije svježeg i nepasteriziranog mlijeka. Do gangrenoznog mastitisa dovodi toksin alfa-hemolizin, te se takav tip mastitisa manifestira samo u pojedinim četvrtima. Bakterijski sojevi *S. aureus* osjetljivi su na većinu antibiotika koji se koriste za liječenje mastitisa, iako istovremeno mogu biti i rezistentni. Također, mnogi čimbenici sprječavaju baktericidno djelovanje antibiotika (mikroapscesi) (Havranek i Rupiće, 2003.; Pavlak i sur., 2008.; Maćešić, 2010.).

2.2.2. Bakterija *Streptococcus agalactiae*

Bakterija *Streptococcus agalactiae* izgleda poput kuglica povezanih u nizove odnosno lance (slika 2.2.). Ona je gram-pozitivna, nesporogena i nepokretna, katalaza negativna te fakultativno anaerobna bakterija. Naziva se još i beta hemolitički streptokok skupine B (Bačić, 2009.).



Slika 2.2. Bakterija *Streptococcus agalactiae*

(Izvor: <https://www.cdc.gov/streplab/groupb-strep/index.html>)

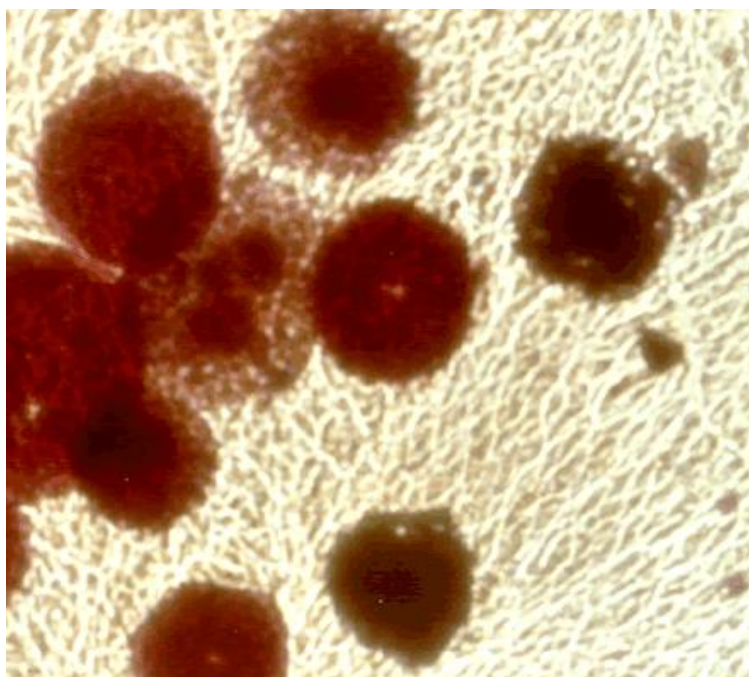
Prema epidemiologiji kontagiozni je uzročnik mastitisa. Najčešće se prenosi tijekom mužnje krava preko ruku mužača, odjeće, podova i potrošnog materijala. Glavni izvor infekcije kod zaraženih krava je vime. Ako se zaražena krava uvede među zdrave krave, infekcija se unutar stada brzo širi. Bakterija *Streptococcus agalactiae* u vime ulazi kroz sisni kanal. Uzrokuje blagi klinički ili jači subklinički mastitis. Također, može uzrokovati bol i oticanje vimena, smanjenje proizvodnje mlijeka, ali i pojavu ugrušaka u mlijeku. Bakterija *S.agalactiae* jedini je uzročnik mastitisa protiv kojeg je liječenje antibioticima izuzetno učinkovito te se još uvijek provodi tijekom laktacije (80 – 90% efikasnosti), a isto tako i tijekom suhostaja (Bačić, 2009.).

2.2.3. Bakterija *Mycoplasma bovis*

U novije doba pojavljuje se infekcija vimena mikoplazmama. Najprisutnija i najpatogenija vrsta bakterije je *Mycoplasma bovis* (slika 2.3.), koja osim što uzrokuje mastitis, u teladi i junadi može biti uzročnik pneumonije i artritisa, te akutnih do subakutnih upalnih procese u različitim organima. Bakterija *Mycoplasma bovis* nije ubikvitarna, ali se pojavljuje u goveda kod kojih se infekcija javlja enzootski. Također, bakterija *Mycoplasma*

bovis uzrokuje latentne infekcije vimena, a time i širenje mikoplazmarnog mastitisa (Bačić, 2009.).

Između bakterija *Mycoplasma bovis* i *Mycoplasma agalactiae* uzročnika mastitisa u ovaca, postoji visoki stupanj srodnosti koja se temelji na antigenskim osobinama. Te dvije vrste samo se mogu djelomično razlikovati serološkom reakcijom inhibicije rasta i imunofluorescijom. Teško ih je razlikovati i pomoću lančane reakcije polimerazom (PCR), budući da se razlikuju u svega nekoliko oligonukleotida. Zbog sličnosti znakova bolesti s onima što se nalaze u ovaca i koza oboljelih od zarazne agalaksije, ta je mikoplazma najprije imenovana kao *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*, a 1976. godine je dobila današnji naziv - *Mycoplasma bovis* (Askaa i Ernø, 1976.).



Slika 2.3. Bakterija *Mycoplasma bovis*

(Izvor: <http://veterina.info/vesti/25-goveda/bolesti-goveda/187-opirnije-o-infekcijama-izazvanim-mikoplazmama>)

Mastitis izazvan bakterijom *Mycoplasma bovis* je vrlo kontagiozan. Bez obzira na stadij laktacije u kojem se krava nalazi, u zaraženom stadu od mastitisa oboli više od 20% muznih krava. Inkubacija ovisi o dozi uzročnika, a iznosi dva do šest dana (Bačić, 2009.). Jedan od najvažnijih znakova mikoplazmarnog mastitisa je promjena konzistencije mlijeka, zatim nagli pad mliječnosti na svega nekoliko mililitara sekreta u razdoblju tri do pet dana

nakon početka bolesti, brzo širenje infekcije s inficiranih na neinficirane četvrti te, konačno, neuspjeh u liječenju antibioticima, što na kraju završava agalaksijom. Otprilike dva tjedna nakon početka bolesti zahvaćene četvrti atrofiraju. Značajno se mijenja konzistencija sekreta vimena, koji je vodenkast do gnojni. Za mikoplazmozni mastitis tipičan je nalaz obilnog taloga u epruveti koji čine krpice fibrina i vodenasti sadržaj iznad njega. Krave tijekom laktacije ne mogu ozdraviti od mikoplazmoznog mastitisa, nikad se ne oporave i potrebno ih je izlučiti iz stada (Šeol i sur., 2005.).

Bakterija *Mycoplasma bovis* uzgaja se na običnim hranjivim podlogama za mikoplazme, tako na primjer kada raste na modificiranoj Hayflickovoj podlozi tvori kolonije nalik „jajetu pečenom na oko“ (Bačić 2009.). Iako se u liječenju infekcija uzrokovanih mikoplazmama koriste mnogi antibiotici i kemoterapeutici, kao što su primjerice oni iz skupine fluorokinolona (enrofloksacin i danofloksacin), teraciklinski pripravci, spektinomycin, gentamicin i spiramicin, važno je znati da potpunog izlječenja gotovo i nema (Šeol i sur., 2005.). Stoga, da bi se smanjila opasnost od širenja infekcije potrebno je izdvojiti iz stada sve bolesne krave, osigurati visok stupanj higijene tijekom mužnje i dezinfekciju pribora, spriječiti pretrpavanje nastambi i redovito provjeravati stupanj higijene u nastambama (Bačić, 2009.).

2.2.4. Okolišni (uvjetovani) uzročnici mastitisa

Uvjetovani uzročnici mastitisa potječu iz okoliša, pojavljuju se uslijed prenapučenosti i neadekvatno izgrađenih štala, nehigijenskih ležišta životinja, nepravilnog pranja i dezinfekcije vimena te neispravnih muznih uređaja. Infekcija vimena uvjetovanim uzročnicima javlja se najčešće krajem suhostaja ili u ranoj fazi laktacije. Životinja u tom razdoblju ima oslabljen imunitet pa je podložnija infekcijama i bolestima. Okolišni uzročnici su koliformne bakterije i streptokoki iz okoliša koji uzrokuju klinički mastitis (Havranek i Rupiće, 2003.; Bačić, 2009.).

Prema Bačiću (2009.), koliformni mikroorganizmi su gram-negativne štapičaste bakterije, koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*, a u njih se ubrajaju: *Echerichia coli*, rodovi *Klebsiella sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.* i *Aerobacter sp.* One su prirodna mikroflora probavnog trakta životinja i ljudi. Šire se fekalnom kontaminacijom okoliša. No, u vimenu ne mogu preživjeti dugo. Prilikom infekcije bakterijom *Echerichia coli* upala nastaje

djelovanjem endotoksina te antibiotici nisu učinkoviti u liječenju. Klinički blagi do srednje jaki mastitis koji je uzrokovan koliformnim mikroorganizmima prolazi sam od sebe. Koliformni mikroorganizmi mogu uzrokovati teške oblike mastitisa, što može dovesti čak i do gubitka četvrti vimena.

Bačić (2009.) u svojoj knjizi navodi da su streptokoki iz okoliša gram-pozitivne, katalaza negativne kugličaste bakterije. U njih se najčešće ubrajaju bakterijske vrste *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* i *Enterococcus faecalis*. Oni se nalaze u stelji, pogotovo u slami, kao i na tijelu krave (ozljedama kože, sluznicama, usnama, itd.). Uzrokuju subkliničke i kliničke infekcije blaže od koliformnih mikroorganizama. Mastitis uzrokovan streptokokima iz okoliša često se javlja u ranoj laktaciji kao rezultat infekcije u prethodnom suhostaju. Kliničke infekcije se liječe antibioticima na osnovu antibiograma.

Prema Bačiću (2009.), *Streptococcus uberis* smatra se uvjetnim patogenom. Ona nema sposobnost vezanja na stanice domaćina pa se vjerojatno umnožava unutar sisnog kanala. Pojedini sojevi su otporni na fagocitozu jer tvore kapsule koje nemaju antigenske osobine. Mastitis koji uzrokuje bakterija *Streptococcus uberis* najčešće se javlja tijekom ljeta u krava u suhostaju i junica. Liječenje antibioticima prilikom uvođenja u suhostaj često je neučinkovito protiv mastitisa uzrokovanog ovom bakterijom. Također, bakterija *Streptococcus dysgalactiae* pripada skupini uvjetovanih uzročnika. Pogodovni čimbenici za nastanak infekcije tom vrstom prilikom čega uglavnom nastaje akutni mastitis, su mužnja na prazno kad u sisi nema dovoljno mlijeka pred kraj mužnje, ozljede sisa, nadražnost kože sisa i sisnog kanala.

2.3. Rezistencija bakterija prema antibioticima

Britanski bakteriolog Alexander Fleming 1928. godine otkrio je penicilin, prvi antibiotik u svijetu. Od tada, otkriveno je mnogo različitih antibiotika koji se naširoko koriste za liječenje raznih bolesti u kliničkoj medicini. Međutim, zbog česte, ponekad i nepotrebne upotrebe antibiotika kako kod ljudi tako i kod životinja, sve je učestalija pojava smanjenog djelovanja antibiotika te se javlja sve veći broj antibiotik rezistentnih bakterijskih vrsta. Otpornost bakterija na lijekove čini ozbiljnu prijetnju zdravlju i sigurnosti hrane. Stoga se javila potreba za pronalaskom alternativnih odnosno novih antimikrobnih tvari s manje

nuspojava i manjom otpornosti na patogene bakterije koji bi zamijenili tradicionalne antibiotike (Zou i sur., 2018.).

Antibiotici su vrlo djelotvorni lijekovi koji sprječavaju rast bakterija, kako u liječenju ljudi tako i životinja. Danas se sve više upotrebljavaju u liječenju životinja, iako njihova primjena nije uvijek učinkovita. Učestalim i nepotrebnim upotrebama antibiotika, dolazi do pojave rezistentnosti bakterijskih vrsta na antibiotike i njihovo djelovanje nema učinka. Bakterije se brzo prilagođavaju okolini te brzo razvijaju mehanizam otpornosti na pripravke koji se koriste u liječenju. Velik broj antibiotika djeluje na isto ciljno mjesto u bakterijskoj stanici pa se uslijed toga bakterije vrlo brzo prilagode (Habrún i sur., 2015.).

Bakterija može razviti rezistenciju na antibiotike na nekoliko načina. Geni odgovorni za rezistenciju mogu biti smješteni na kromosomu ili na plazmidu, ili pak i na jednoj i na drugoj staničnoj DNK (Kalenić, 2000.). Glavne pogreške prilikom liječenja su izbor nedjelotvornog antibiotika, krivo doziranje, davanje pogrešne kombinacije antibiotika, nastavak liječenja nakon pojave rezistentnosti. Pri odabiru antibiotika treba voditi računa o kliničkom djelovanju lijeka, toksičnosti za životinju, rizicima od nastanka mikrobne rezistentnosti, utjecaju na fiziološku mikrofloru (Šeol i sur., 2010.). Rezistencija bakterija na antibiotike nastaje: malim promjenama na jednom paru baza u genomu, takozvanim točkastim mutacijama, te velikim promjenama u genomu, odnosno, preinakama velikih dijelova genoma ili unosom izvanjske DNK (procesima konjugacije, transformacije, transdukcije ili transpozicije) (Kalenić, 2000.). Porast rezistencije nekih bakterijskih sojeva, koji izazivaju mastitise, posljedica je njihove otpornosti te se tako smanjuje stopa bakteriološkog izlječenja antibioticima u laktaciji i suhostaju. Stoga, potrebno je smanjiti učestalost korištenja antibiotika u liječenju krava, a poboljšati preventivne i higijenske mjere na farmi u cilju smanjenja broja mastitisa. Antibiotike treba koristiti ciljano, prema tipu uzročnika, obavezno se pridržavajući navedenih uputa za uporabu i liječenje uvijek provesti do kraja (Bačić, 2009.). Prema Habrunu i sur. (2015.) U Hrvatskoj u provedenim istraživanjima do danas, za osjetljivost stafilokoka prema antibioticima najučinkovitije tvari bile su cefoperazon i kombinacija amoksicilina s klavulanskom kiselinom, a učinkovitost je bila između 97 – 100% (Jurmanović i sur., 2012). Leskovec i sur. (2015.) ističu da je od ranije poznata neosjetljivost stafilokoka na ostale beta-laktamske antibiotike poput penicilina. Bakterija *S. aureus* je u znatno manjoj mjeri osjetljiva na aktivne tvari koje su do sada bile vrlo učinkovite. U istraživanju, postotak osjetljivih sojeva *S. agalactiae* prema amoksicilinu s

klavulanskom kiselinom i prema cefoperazonu iznosi oko 87%. Bakterije vrste *S. dysgalactiae* su u najvećem broju uzoraka bili osjetljivi na amoksisilin s klavulanskom kiselinom, dok su najveću rezistentnost imali prema streptomycinu. Prema Kalmus i sur. (2011.) izolati bakterije *S. aureus* imali su visoku razinu otpornosti na penicilin (61,4%) i ampicilin (59,5%). Stoga, potrebno je izbjegavati lijekove širokog spektra djelovanja, osim u slučajevima akutnog mastitisa kad je potrebno započeti liječenje životinje čim prije.

2.4. Liječenje

Prilikom liječenja krava potrebno je prvo na osnovu simptoma odrediti tip mastitisa. Krava oboljela od mastitisa je često lošeg općeg stanja, dehidrirana, bez apetita i poremećene probave pa ju je potrebno što brže liječiti (Bačić, 2009.).

Potporno liječenje služi kako bi se krava brže i lakše oporavila od upale vimena. U težim slučajevima oboljenja potrebno je kravi dati infuziju u obliku fiziološke otopine intravenozno ili pumpanjem tekućine sondom direktno u želudac da se smanji stupanj dehidracije ili čestim izmuzivanjem mlijeka kako bi se uklonili toksini i smanjio broj bakterija koje uzrokuju štetu u vimenu te kako bi se stimulirao obrambeni mehanizam krave. Također, stanje bolesnog vimena se može olakšati primjenom hladnih obloga (Havranek i Rupić, 2003.; Bačić, 2009.). Kada su znaci upale vimena kod krave jače izraženi, veterinar većinom propisuje nesteroidne protuupalne lijekove. Ako se koriste na vrijeme, protuupalni lijekovi smanjuju simptome upale i vrijeme oporavka životinje, kao i brže vraćanje razine proizvodnje mlijeka koja je bila prije mastitisa. Ako je krava gravidna, ne preferiraju se steroidni lijekovi jer mogu dovesti do pobačaja. Steroidni lijekovi imaju jače djelovanje, poboljšavaju stanje krave, ali ne eliminiraju uzročnike. Tijekom liječenja potrebno je ukloniti kliničke znakove mastitisa, ali i bakterije koje su odgovorne za razvoj mastitisa (Bačić, 2009.).

Prema Bačiću (2009.), antibiotici za intramamarnu primjenu koriste se kao pomoć imunološkom sustavu krave u eliminaciji patogenih bakterija iz vimena. Intramamarni antibiotici se koriste nakon provedene bakteriološke pretrage mlijeka iz oboljelog vimena i na temelju antibiograma. Za liječenje se koriste antibiotske masti koje se unose u vime prema dobivenom antibiogramu. Mast se unosi aplikatorom kroz sisni kanal u ispražnjeno vime kako bi dospjela do žarišta upale.

Liječenje antibiotskim mastima za vime provodi se nekoliko uzastopnih dana, svakih 12 do 24 sata, uvijek uz prethodno potpuno izmuzivanje svih četvrti vimena. Upala se može, osim antibioticima, uspješno liječiti i sulfonamidima, antihistaminicima i drugim kemoterapeuticima koji uspješno uništavaju uzročnike upale (Havranek i Rupić, 2003.).

2.5. Ekonomski gubitci uslijedi pojave mastitisa

Već od prije je poznato da mastitis uzrokuje najveće ekonomske gubitke u mliječnom govedarstvu. Čimbenici koji utječu na ekonomske gubitke farmi su: smanjena proizvodnja mlijeka, troškovi veterinarskih usluga, lijekova i liječenja oboljele životinje, prijevremeno izlučivanje životinja, vrijednost odbačenog mlijeka i smanjena plodnost životinje. Klinički i subklinički mastitis utječu na smanjenje količine proizvodnje mlijeka, koje može biti trajno ili privremeno. Oporavak vimena ovisi o tijeku infekcije i vrsti uzročnika mastitisa (Bačić, 2009.).

Bačić (2009.), iskazuje kako s porastom broja somatskih stanica opada proizvodnja mlijeka, a sa svakim udvostručenjem broja somatskih stanica proizvodnja mlijeka opada za 2%. Pojava mastitisa ima utjecaj i na fizikalno kemijska svojstva mlijeka, zbog čega takvo mlijeko nije pogodno za preradu u mliječne proizvode. Tijekom liječenja mastitisa u mlijeku zaostaju antibiotici, pa se ono mora neškodljivo uklanjati uzimajući u obzir period karence. Krave oboljele od mastitisa imaju duže međutelidbeno razdoblje, a s tim i smanjenu proizvodnju mlijeka. Intenzivna, visoka proizvodnja mlijeka zbog velikog prijevremenog izlučenja krava, može dovesti do većeg remonta stada u odnosu na izlučenje što ima za posljedicu veće ekonomske gubitke.

Ovisno o proizvodnji tijekom laktacije, novija istraživanja pokazuju da je ukupni gubitak mlijeka zbog kliničkog mastitisa između 110 i 550 litara po laktaciji. Tijekom kliničkog mastitisa neupotrebljivo mlijeko, lijekovi i liječenje, prijevremeno izlučenje i dodatni rad uzrokuju velike troškove, a procjenjuje se da se kreće od 500 do 700 kuna po kravi. Smatra se da oko 88% gubitaka nastaje zbog manje proizvodnje mlijeka te higijenski i zdravstveno neprihvatljivog mlijeka koje se mora neškodljivo ukloniti (Bačić, 2009.).

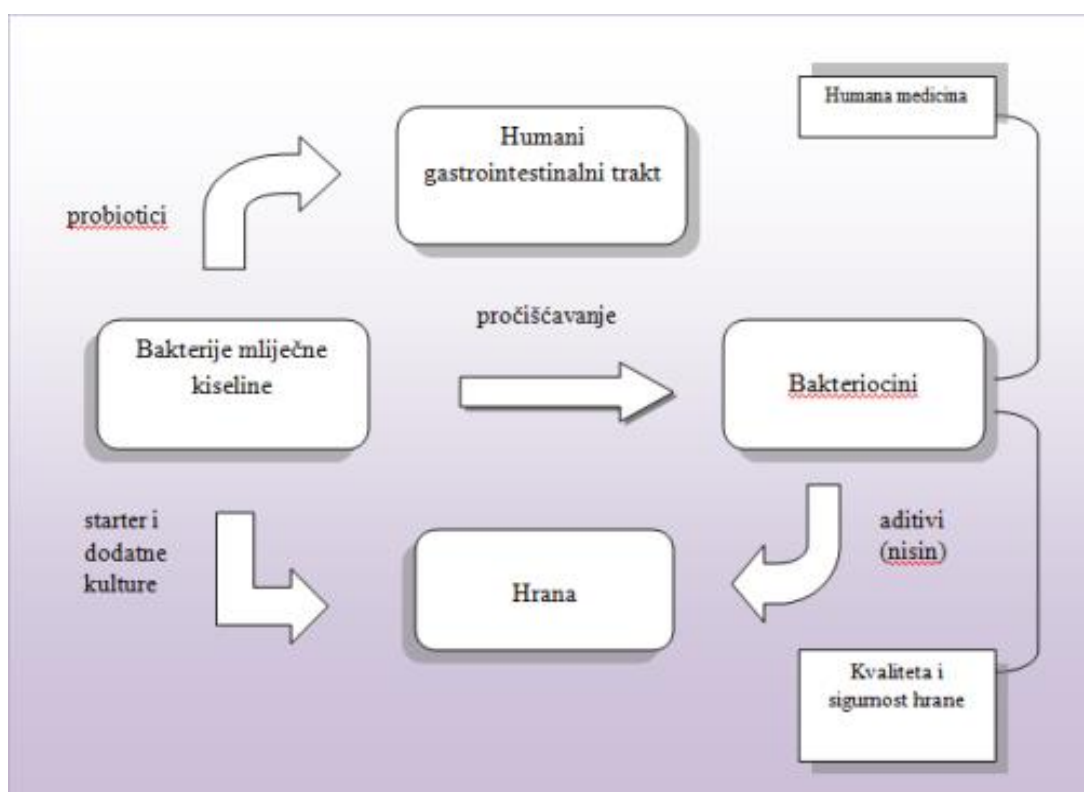
3. Bakteriocini

Naziv „bakteriocin“ prvi se puta spominje 1953. godine, a danas je poznato da oko 99% bakterija stvara barem jedan bakteriocin, a također ih sintetiziraju i neke arheje (Nandane i sur., 2007; Imran, 2016). Bakteriocini su ribosomalno sintetizirani antimikrobni peptidi ili proteini koje stvaraju brojne bakterijske vrste (Samaržija, 2015.). Prema svojstvima, bakteriocini su uglavnom molekule manjih molekulskih masa koje rijetko prelaze 10 kDa. Često se posttranslacijski modificiraju te su podložni razgradnji proteolitičkim enzimima, osobito proteazama gastrointestinalnog trakta sisavaca, što ih čini sigurnim za ljudsku konzumaciju. Bakteriocini su općenito kationske amfipatske molekule jer sadrže više ostataka lizina i arginina. U većini slučajeva, bakteriocini imaju uski spektar djelovanja te prema tome inhibiraju sojeve usko srodnih bakterijskih vrsta (Zacharof i Lovitt, 2012.).

Pojedini bakteriocini imaju i široki spektar inhibicijskog djelovanja, poput nizina koji iskazuje antimikrobnu aktivnost prema brojnim gram-pozitivnim bakterijama. Tipičan primjer je nizin, bakteriocin kojeg sintetizira bakterija *Lactococcus lactis*, bakterija mliječne kiseline (BMK). One se danas intenzivno istražuju zbog mogućnosti njihove primjene u prehrambenoj industriji kao biokonzervansa (Šušković i sur., 2010.) (Slika 3.1.). Pojedini sojevi BMK osim bakteriocina proizvode još i niz drugih metaboličkih spojeva poput diacetila, acetona, vodikovog peroksida, reuterina, reutericiklina, slabih organskih kiselina (Vesковиć Moračanin i sur., 2014.). Bakteriocini, iako imaju antibiotska svojstva, ne klasificiraju se kao antibiotici. Za razliku od antibiotika koji imaju široki spektar djelovanja, aktivnost bakteriocina je užeg spektra, odnosno bakteriocini određene vrste bakterija aktivni su protiv sojeva iste vrste ili srodnih vrsta. Bakteriocini su termostabilni i aktivni u širokom rasponu pH vrijednosti dok su antibiotici termolabilni i aktivni u uskom rasponu pH vrijednosti. Bakteriocini nemaju boju, okus i miris dok antibiotici imaju. Bakteriocini su sigurni za konzumaciju zahvaljujući tome što ih proteolitički enzimi lako razgrađuju i uglavnom nisu toksični za eukariotske stanice, a antibiotici imaju nisku razgradivost i toksični su za većinu eukariotskih stanica. Otpornost na bakteriocine ostvaruje se prilagodbom putem promjena u sastavu stanične membrane, dok se rezistentnost na antibiotike ostvaruje genetskim promjenama kojima se inaktivira aktivna komponenta. Tako dugotrajna primjena antibiotika, to jest izloženost patogenih bakterija ili uzročnika kvarenja, može dovesti do razvoja otpornosti na iste (Bastos i sur., 2015). Mehanizmi putem kojih se ostvaruje njihova otpornost obično su povezani s promjenama u

staničnom omotaču bakterija. Te promjene mogu uzrokovati smanjeno vezivanje ili umetanje bakteriocina, odstranjivanje bakteriocina, izbacivanje bakteriocina putem efluks pumpi i razgradnju bakteriocina (Bastos i sur., 2015.). Nasuprot tome, Perez i sur. (2014.) ne pronalaze dokaz o pojavi otpornosti bakterija na bakteriocine što bi se moglo objasniti njihovim brzim mehanizmom djelovanja koji stvara pore u membrani ciljane bakterije, čak i pri iznimno niskim koncentracijama. Možda je ipak najznačajnija prednost bakteriocina u odnosu na konvencionalne antibiotike činjenica da je njihova biosinteza relativno jednostavna i odvija se u primarnoj fazi rasta, dok su antibiotici sekundarni metaboliti (Zacharof i Lovitt, 2012.; Perez i sur., 2014.).

Glavne razlike između bakteriocina i antibiotika prikazane su u tablici 3.1.



Slika 3.1. Prikaz moguće primjene bakteriocina bakterija mliječne kiseline

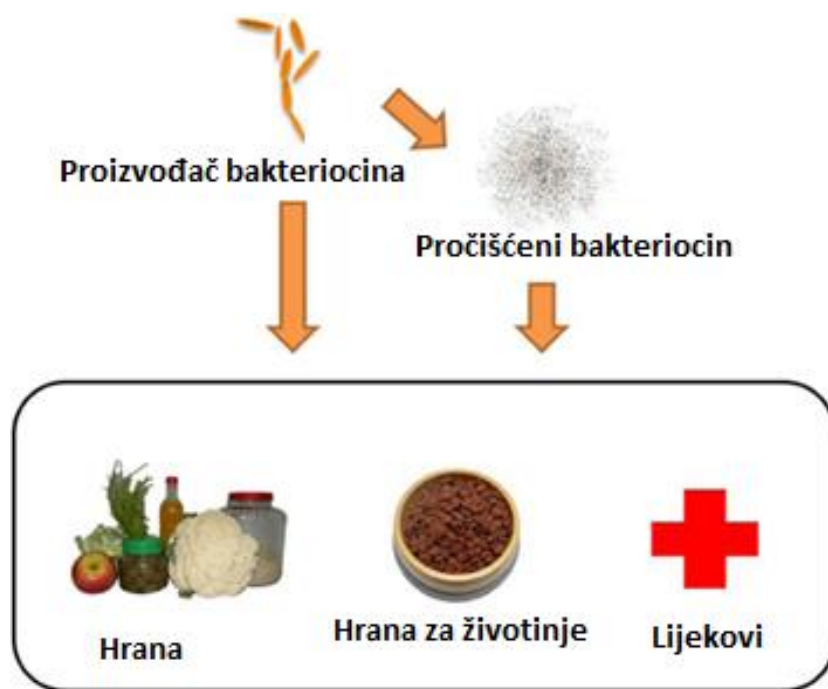
(Izvor: prilagođeno prema De Vuyst i Leroy, 2007.)

Tablica 3.1. Glavne razlike između bakteriocina i konvencionalnih antibiotika

Karakteristike	Bakteriocini	Antibiotici
Primjena	Prehrana/Klinička	Klinička
Sinteza	Ribosomalna	Sekundarni metaboliti
Spektar djelovanja	Većinom uzak	Većinom širok
Intenzivnost djelovanja	Aktivni u nano-mikro molarnom rasponu	Aktivni u mikro-mili molarnom rasponu
Proteolitičko enzimsko razgradnja	Visoka	Umjerena – Nepostojeća
Termostabilnost	Visoka	Niska
Aktivni pH raspon	Širok	Uzak
Boja/okus/miris	Ne	Da
Podložnost bioinženjeringu	Da	Ne
Mogući mehanizmi razvijanja rezistencije na ciljane stanice	Prilagodba putem promjena u sastavu stanične membrane	Genetske promjene kojima se inaktivira aktivna komponenta
Način djelovanja	Stvaranje pora, inhibicija biosinteze stanične stijenke	Stanična membrana ili unutarstanični ciljevi
Toksičnost prema eukariotskim stanicama	Relativno ne	Da

(Izvor: Prilagođeno prema Perez i sur., 2014.)

Zbog svog antimikrobnog djelovanja, provedena su brojna istraživanja o praktičnoj primjeni bakteriocina koja se prvenstveno odnose na proizvodnju i očuvanje zdravstvene ispravnosti hrane sprečavajući rast neželjenih mikroorganizama uzročnika bolesti te njihovu primjenu u području medicine i veterine, što je prikazano u tablici 3.2. i na slici 3.2. (Pieterse i Todorov, 2010.).



Slika 3.2. Primjena bakteriocina

(Izvor: https://www.frontiersin.org/files/Articles/91530/fmicb-05-00241-r4/image_m/fmicb-05-00241-g002.jpg)

Bakteriocini, identificirani za potencijalnu uporabu kao antimikrobne tvari, uključuju lantibiotike koje proizvode gram–pozitivne BMK te kolicine i mikrocine koje proizvode gram-negativne bakterije (Gillor i sur., 2005.). Bakteriocini pronalaze svoju praktičnu primjenu u području medicine kao na primjer u tretmanima liječenja kožnih infekcija te liječenja upalnih procesa i čira na želucu kojeg uzrokuje *Helicobacter pylori*. Također, istraženo je i korištenje bakteriocina bakterija mliječna kiseline u veterinarskoj medicini, odnosno u liječenju upale vimena kod muznih životinja (Pieterse i Todorov, 2010.; Cuellar i sur., 2016.). U prevenciji i liječenju mastitisa kod muznih životinja najbolje su istraženi nizin A, lakticin 3147, aureocin A70, nizin Z i macedocin ST91KM.

Tablica 3.2. Potencijalna primjena nekih bakteriocina u medicini i veterini

Bakteriocin	Bakterija koja proizvodi bakteriocin	Potencijalna uporaba
Gram-pozitivne bakterije		
Nizin	<i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Liječenje čira na želucu Antimikrobna aktivnost u medicinskim uređajima poput katetera Liječenje infekcija uzrokovanih s <i>S.pneumonia</i> Liječenje mastitisa kod stoke Vaginalna kontraceptivna tvar
Lakticin 3147	<i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Liječenje mastitisa kod stoke
Galliderm	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Liječenje kožnih infekcija poput akni
Epidermin	<i>S.epidermis</i>	Liječenje kožnih infekcija poput akni
Mutacin B-Ny266	<i>Streptococcus mutans</i>	Tretiranje bakterijskih infekcija izazvanih meticilin rezistentnim stafilokokima
Tomicid	<i>Streptococcus sp.Thom-1606</i>	Djelovanje na streptokokne infekcije dišnih puteva kod djece
Gram-negativne bakterije		
Mikrocini J25 i 24	<i>E.coli</i>	Liječenje <i>E.coli</i> i salmonelne infekcije kod kokoši
Kolicini E1,E4,E7, E8,K &S4	<i>E.coli</i>	Liječenje hemoragičnog kolitisa i hemolitičkog uremijskog sindroma koje uzrokuje <i>E.coli</i> 0157:H7

(Izvor: Pieterse i Teodorov, 2010.)

3.1. Klasifikacija bakteriocina BMK

Bakteriocini se mogu klasificirati na temelju molekulske mase, kemijske strukture, toplinske i enzimatske stabilnosti, načina djelovanja, antimikrobne aktivnosti ili prisutnosti posttranslacijski modificiranih aminokiselinskih ostataka (Zou i sur., 2018.). Zbog neprestanog povećanja broja novo identificiranih bakteriocina klasifikacija bakteriocina vrlo je kompleksna, odnosno mijenja se i nadopunjuje. Stoga, ne postoji njihova jedinstvena podjela zbog različitih klasifikacijskih pristupa. Tako su na primjer Cotter i sur. (2005.)

predložili shemu klasifikacije bakteriocina gram-pozitivnih bakterija koje uključuju bakterije mliječne kiseline. Prema toj shemi, bakteriocini su podijeljeni u 2 kategorije: lantibiotici (skupina I) i bakteriocini koji ne sadržavaju lantionin (skupina II) dok se Klaenhammere-ovom klasifikacijom bakteriocini dijeli u četiri skupine, a koja je detaljnije prikazana u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Klasifikacija bakteriocina prema Klaenhammeru

Razred	Osnovne karakteristike	Bakteriocini BMK
I – Lantibiotici <i>Ia – linearni</i> <i>Ib – globularni</i> <i>Ic – višekomponentni</i>	Modificirani, termostabilni, <5kDa Stvaraju pore, kationski Enzimski inhibitori, nekationski Dipeptidi	Nizin, Lakticin 481, Plantaricin C / Let3147, Plantaricin W
II – Nemodificirani peptidi <i>IIa – Pediocin bakteriocini</i> <i>IIb – mješoviti</i> <i>IIc – višekomponentni</i>	Termostabilni, <10kDa Antilisterijalni, YGNGV konzervirani motiv Bakteriocini ne-slični pediocinu Dipeptidi	Pediocin PA1/AcH, Enterocin A, Sakacin A Enterocin B, L50, Karnobakteriocin A Laktokokcin G, Plantaricin S, Laktacin F
III – Veliki proteini <i>IIIa – bakteriolizini</i> <i>IIIb – ne-lizini</i>	Termolabilni, >30kDa Razgradnja stanične stijenke Citosolni ciljevi	Enterolizin A, Len972 Kolicin E2-E9
IV – Ciklički peptidi	Termostabilni, glava-rep peptidna veza	AS-48, Gasericin A

(Izvor: Vesković Moračani i sur., 2014.)

Prema kemijskoj strukturi bakteriocini BMK dijele se u tri skupine. Prvu skupinu čine termostabilni lantibiotici (riječ derivirana iz antibiotika koji sadrži lantiotin) u koje ubrajamo nizin, subtilin ili epidermin. Lantibiotici su po svojoj kemijskoj strukturi mali peptidi veličine 5-10 kDa (19-38 aminokiselinska ostatka) koji sadrže jedan ili oba modificirana aminokiselinska ostatka lantionina. Najpoznatiji lantibiotik je nizin koji se kao sigurni biokonzervans priznat od FAO/WHO organizacija (engl. *Food and Agriculture Organization/World Health Organization*), koristi se u prehrambenoj industriji od 1969. godine. Tako je nizin E234 uključen i na europsku listu dopuštenih prehrambenih aditiva (Cotter i sur., 2005). Drugu skupinu bakteriocina čini heterogena skupina malih termostabilnih peptida (<10 kDa). Prema svojoj kemijskoj strukturi i baktericidnom

djelovanju prema drugim bakterijskim vrstama, oni su podijeljeni u tri podskupine (IIa, IIb i IIc). U podskupinu IIa pripadaju antilisterijalni - pediocin bakteriocini odnosno pediocin, enterocin i sakacin, a sadrže konzervirani motiv Y-G-N-G-V na N-terminalnom kraju i barem jedan disulfidni most povezan s dva cisteinska ostatka (Drider i sur., 2006). To je najčešće proučavana skupina bakteriocina zbog svoje specifične antimikrobne aktivnosti prema vrlo često prisutnom patogenu u hrani, bakteriji *Listeria monocytogenes* (Cotter i sur., 2005). Sposobne su ih sintetizirati i mnoge vrste BMK, primjerice *Pediococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp. i *E. faecium*. Ti bakteriocini imaju posebno jaki antibakterijski učinak na vrste unutar roda *Listeria* i nešto slabije baktericidno djelovanje na *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*, *S. aureus*. Istodobno oni ne pokazuju antagonizam prema vrstama rodova *Lactococcus* i *Leuconostoc*.

Podskupinu IIb čine dva bakteriocina, plantaricin i laktacin F koji imaju simultano baktericidno djelovanje koje uključuje slabljenje potencijala membrane i smanjenje intercelularne koncentracije ATP-a prema određenim bakterijskim vrstama. Treću podskupinu (IIc) čine bakteriocini koji imaju kovalentnu vezu između C i N terminalnog završetka peptidnog lanca i zbog toga imaju cikličnu strukturu. Predstavnici te skupine su enterocin AS-48, cirkularin A i reuteričiklin. Skupinu III čine veliki termolabilni peptidi (>30 kDa), koje u usporedbi s ostalim bakteriocinima karakterizira drugačiji mehanizam baktericidnog djelovanja. Naime, njihov N - terminalni kraj peptidnog lanca homologan je bilo kojoj endopeptidazi uključenoj u sintezu stanične stijenke bakterija, a C-terminalnim krajem prepoznaju ciljanu bakterijsku stanicu. Zbog toga se njihovo baktericidno djelovanje prema određenim bakterijskim vrstama manifestira lizom bakterijske stanice (Samaržija, 2015.). Prema Perez i sur. (2014.) drugi naziv bakteriocina ovog razreda je bakteriolizini.

3.2. Nizini

Nizin je jedan od dva komercijalno značajna bakteriocina te se nalazi na popisu prehrambenih aditiva pod nazivom E234. Otkriven je 1928., kada je utvrđeno da određena tvar koja je sintetizirana iz bakterije *Streptococcus lactis* (danas poznata kao *Lactococcus lactis* spp. *lactis*) inhibira rast bakterije *Lactobacillus bulgaricus*. Nedugo nakon toga, uočava se veliki potencijal nizina u primjeni osobito u polju sigurnosti hrane. Prvi put se na tržištu

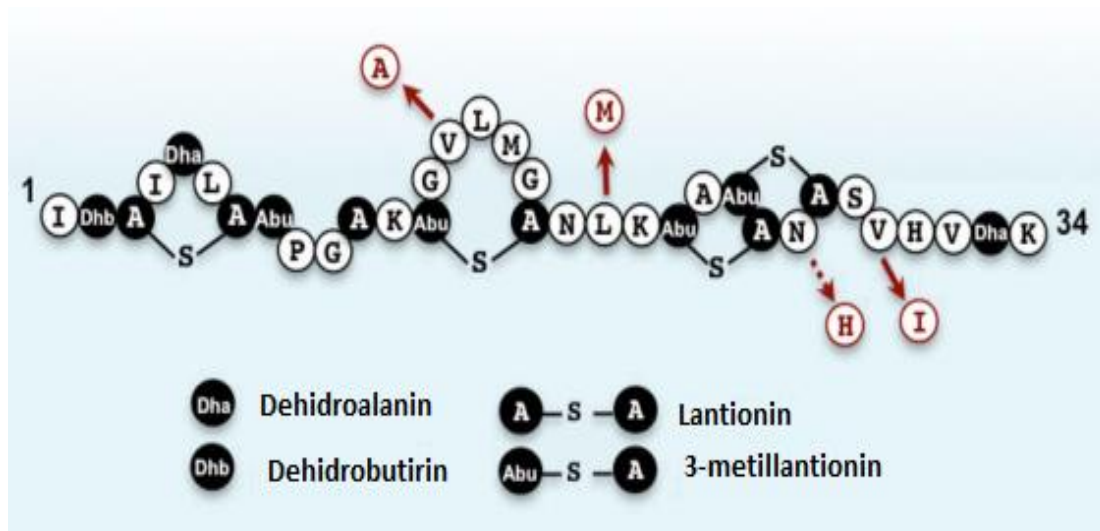
pojavio 1953. i to u Engleskoj, dok je njegova intenzivna primjena započela 1957. godine u proizvodnji sira. Danas se upotrebljava u 50-tak zemalja diljem svijeta, a priznat je 1969. od strana FAO/WHO organizacija (Vesković Moračanin i sur., 2014.). Otkriveno je da nizin posjeduje antimikrobno djelovanje i inhibira stvaranje spora kod nekih vrsta roda *Bacillus* i *Clostridium*. Iako su spore tih bakterija osjetljivije na nizin od vegetativnih stanica, on ih ne uništava, već ima inhibitorno djelovanje na njihov rast. Osjetljivost spora na nizin povećava se uslijed izloženosti visokim temperaturama (Leroy i De Vuyst, 2010.). Zbog toga je za sprječavanje rasta spora nužna stalna prisutnost nizina u određenoj namirnici.

Nizin je bakteriocin razreda I i tipa A čija molekulska masa iznosi 3,5 kDa. Struktura mu je pentaciklička, sastoji se od 34 aminokiseline, termostabilan je, a najbolje djeluje pri nižim pH vrijednostima. Kod dužeg zagrijavanja na 121°C pri pH vrijednosti 2, nizin ostaje stabilan, no ta se termostabilnost smanjuje pri pH vrijednostima od 5 do 7. Otporan je na probavne enzime tripsin, pepsin, erepsin, elastazu i karboksipeptidazu A, dok je osjetljiv na α -kimotripsin (Zacharof i Lovitt, 2012). Silva i sur. (2018.) navode kako je poznato osam varijanti nizina, od kojih četiri (A, Z, Q, F) sintetizira *Lactococcus lactis*, a ostalih četiri (U, U2, H, P) pojedini *Streptococcus* sojevi.

Djelotvornost nizina ovisi o brojnim čimbenicima. Za ilustraciju, niska pH vrijednost i dodatak natrijevog klorida, temperatura, struktura, sastav i mikrobna populacija neke namirnice poboljšavaju aktivnost nizina. Nadalje, pojedini tehnološki postupci mogu utjecati na aktivnost nizina, poput na primjer homogenizacije mlijeka koja smanjuje njegovo djelovanje na bakteriju *Listeria monocytogenes*. Upotreba nizina u proizvodnji mliječnih proizvoda predstavlja izazov zbog svog inhibitornog djelovanja na mikrobne mljekarske kulture, slabe topivosti pri neutralnoj pH vrijednosti i mogućnosti pojave pogrešaka okusa. Iako gram-negativne bakterije nisu podložne utjecaju nizina, mogu postati osjetljive na njega zbog propusnosti vanjskog dijela membrane uslijed zagrijavanja ili zamrzavanja (Silva i sur., 2018.).

Nizin A koristi se kao biokonzervans u prehrambenoj industriji zahvaljujući širokom spektru djelovanja i brzom antibakterijskom djelovanju. Struktura nizina A gotovo je jednaka onoj nizina Z, odnosno razlikuju se po tome što se kod nizina A na poziciji 27 nalazi histidin, dok se kod nizina Z nalazi asparagin. Nizin Q otkriven je u novije vrijeme, a po nekim se karakteristikama razlikuje od nizina A i nizina Z, iako im je struktura vrlo slična (slika 3.3.) . Sintetizira ga bakterija *Lactococcus lactis* 61-14 koja je izolirana iz riječne vode. Od nizina Z

razlikuje se u tri aminokiselinska ostatka te na poziciji 15 umjesto alanina sadrži valin, na poziciji 21 umjesto metionina sadrži leucin i na poziciji 30 umjesto izoleucina sadrži valin, dok su razlike između nizina Q i nizina A iste. Povrh toga, nizin Q još na poziciji 27 umjesto histidina sadrži asparagin. Također, otkriveno je kako je nizin Q otporniji na oksidaciju od nizina A i Z, kojima oksidacija u većoj mjeri smanjuje aktivnost (Perez i sur., 2014).



Slika 3.3. Prikaz primarne strukture nizina Q i njegovih zamjenskih aminokiselinskih ostataka koji čine druge tipove nizina, nizin A i Z. Punim strelicama označene su zamjene za nizin A i Z, dok isprekidana označava zamjenu samo za nizin A

(Izvor: Prilagođeno prema Perez i sur., 2014.)

Određene studije opisuju karakterizaciju nizina Z, proizvedenog od soja *L. lactis*, izoliranog iz Boze – tradicionalne turske fermentirane hrane na bazi žitarica. U toj studiji, bakteriocin toga soja, inhibirao je ne samo srodni soj, već i gram-pozitivne bakterije poput *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*. Tretman s proteinazom K i α -kimotripsinom inaktivirao je tu antimikrobnu tvar. Nizin Z je termostabilan pri temperaturi od 100°C tijekom 20 minuta. Različiti pH, enzimi i termički tretman, doveli su do zaključka da je bakteriocin kojeg je proizveo soj *Lactococcus lactis* spp. *lactis* GYL32 u stvari nizin Z. Također, rezultati sekvencijske analize potvrđuju da se radi o nizinu Z te da njegove genetske determinante kodiraju na gensku DNA. Molekularna masa nizina Z određena je metodom Tricin – SDS-elektroforezom te iznosi 6,700 Da. Rezultati studije sugeriraju da se nizin Z,

proizveden iz soja *L. lactis* spp. *lactis* GYL32, može koristiti kao starter kultura za poboljšanje kvalitete fermentiranih proizvoda (Ramith i sur., 2015.).

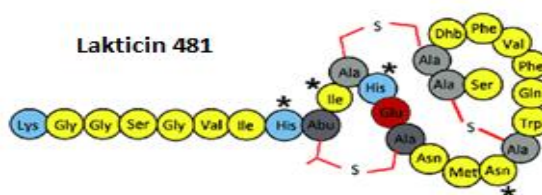
3.3. Lakticini

Lakticine sintetiziraju određeni sojevi bakterije *Lactococcus lactis*, a glavni predstavnici su lakticin 3147 i lakticin 481 te u novije vrijeme otkriveni lakticini Q i Z. Lakticini 3147 i 481 ubrajaju se u lantibiotike podskupine Ia, dok se lakticini Q i Z ubrajaju u razred IIId. Lakticin 481 sastoji se od jednog peptida te je građen od 27 aminokiselina i molekulska masa mu iznosi 2,9 kDa (slika 3.4.). Ima srednje širok spektar djelovanja te je aktivan protiv bakterija *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes* te BMK (Silva i sur., 2018.).

Lakticin 3147 otkriven je 1994. godine, a proizvodi ga soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DPC3147, izoliran iz kefirnih zrna. Sastoji se od dva peptida, LtnA1 i LtnA2. Prvi je građen od 30 aminokiselina i ima molekularnu masu 3,3 kDa, a zbog izdužene strukture sličan je lantibiotičima podskupine Ia (slika 3.5.). LtnA2 građen je od 29 aminokiselina, molekularna masa iznosi mu 2,8 kDa, a sličan je globularnim lantibiotičima tipa B. Oba peptida potrebna su za inhibiciju sinteze stanične stijenke bakterija. Lakticin 3147 ima široki spektar djelovanja na gram-pozitivne bakterije, aktivan je u malim koncentracijama i u širokom rasponu pH vrijednosti. Inhibira rast bakterija uzročnike kvarenja i patogene bakterije kao što su *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes*, *S.aureus*, *S.thermophilus*, *Bacillus* sp., *Pediococcus pentriceans*, *Lactobacillus* sp. i većinu streptokoka koji uzrokuju mastitis (Pieterse i Todorov, 2010.).

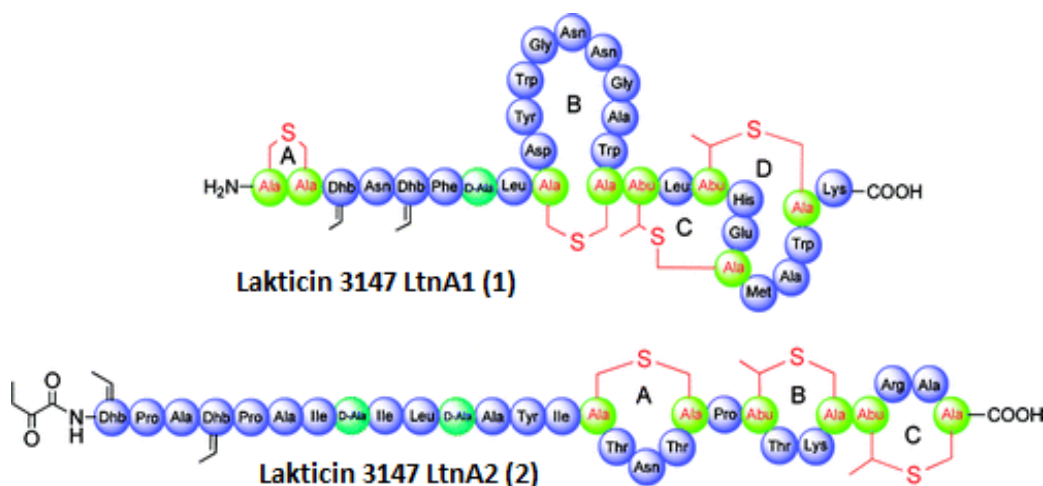
Zbog svoje termostabilnosti, pogodan je za korištenje u formi praha u kojoj je djelotvoran protiv patogena u raznim mliječnim proizvodima. Osim u prehrambenoj industriji, lakticin 3147 koristi se i u medicini (Leroy i De Vuyst, 2010). Istraživanjima je utvrđeno da lakticin 3147 može pridonijeti oralnom zdravlju zahvaljujući svojoj sposobnosti da inhibira oralne streptokoke. Nadalje, zbog topivosti i aktivnosti pri fiziološkoj pH vrijednosti, djelotvoran je u kontroli infekcija izazvanih bakterijom *Clostridium difficile* koja je uzročnik dijareje i zaraznog gastroenteritisa, a da pri tom nema veliki utjecaj na normalnu crijevnu mikrofloru. Kada se primjenjuje s nizinom, djeluje na infekcije izazvane mikobakterijama. Također, u kombinaciji s antibioticima polimiksinom A ili polimiksinom E,

djelotvoran je protiv gram-negativnih bakterija kao što su *Cronobacter* i *Escherichia coli* (Villa i sur., 2016.).



Slika 3.4. Prikaz Lakticina 481

(Izvor: Prilagođeno prema https://www.researchgate.net/figure/Structures-of-the-lantibiotics-Nisin-A-Pep5-Lacticin-481-Nukacin-ISK-1-with-charged_fig1_49841459)

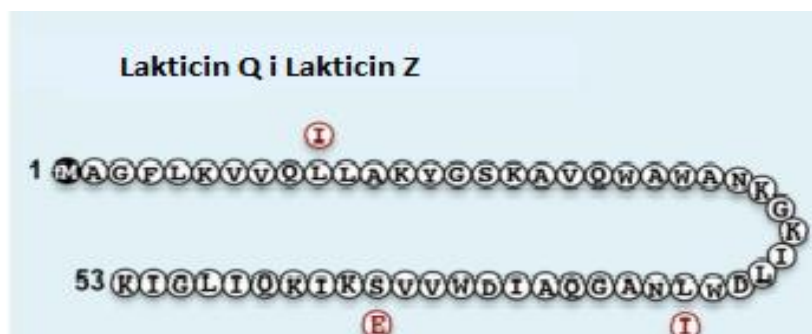


Slika 3.5. Prikaz sinteze oba peptida lakticina 3147

(Izvor: Prilagođeno prema Liu i sur. 2011.)

Lakticin Q sastoji se od 53 aminokiseline, a sintetizira ga bakterija *Lactococcus lactis* QU 5 koja je izolirana iz kukuruza. Ima široki spektar djelovanja na gram-pozitivne bakterije, aktivan je u širokom rasponu pH vrijednosti i alkalnim uvjetima, te je termostabilan. U usporedbi s drugim bakteriocinima BMK ima brže baktericidno djelovanje, a vrlo je aktivan protiv *Bacillus* vrsta (Zendo, 2013). Fujita i sur. (2007.) navode kako lakticin Q ostaje stabilan na 100°C kroz 15 minuta i pH vrijednosti od 2 do 10. Također zadržava 25% svoje aktivnosti nakon tretmana u autoklavu pri 121°C kroz 15 minuta.

Lakticin Z građen je od 53 aminokiseline te je prema strukturi i aktivnosti sličan lakticinu Q od kojeg se razlikuje u tri aminokiseline (slika 3.6.). Sintetizira ga bakterija *Lactococcus lactis* QU 14 izolirana iz probavnog sustava konja. Djeluje protiv raznih gram-pozitivnih bakterija. Također je termostabilan te zadržava potpunu stabilnost do 100°C, a kao i lakticin Q, ostaje stabilan pri alkalnim pH vrijednostima (Zendo, 2013.).



Slika 3.6. Prikaz strukture lakticina Q i Z , aminokiselinski ostaci prikazani crvenom bojom predstavljaju zamjenske ostatke za oblik lakticina Z

(Izvor: Prilagođeno prema Perez i sur. 2014.)

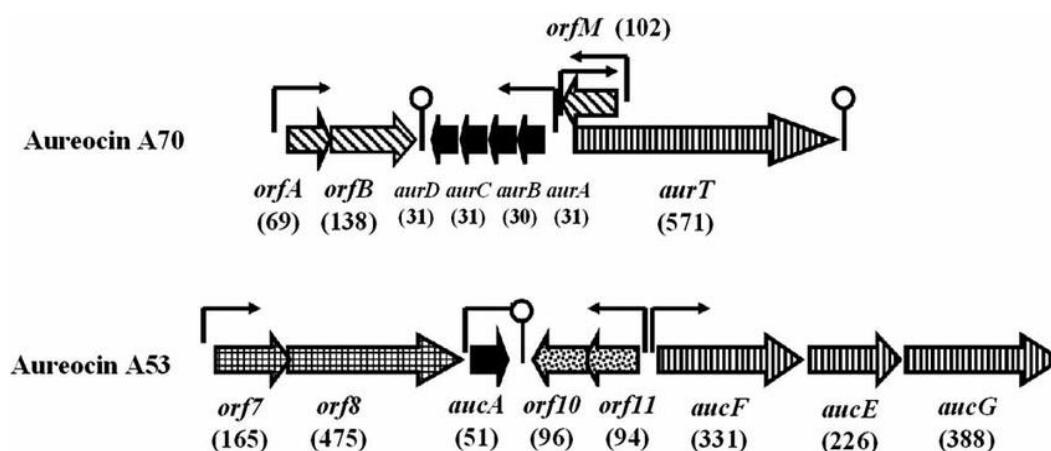
3.4. Aureocini

Aureocini su bakteriocini koje proizvode razni sojevi bakterije *Staphylococcus aureus*. Najpoznatiji predstavnici su aureocin A70 i aureocin A53 (slika 3.7). Oba spadaju u skupinu II bakteriocina. To su mali peptidi koji ne sadržavaju modificirane aminokiseline. Aureocin A70 je multipeptidni bakteriocin koji se sastoji od četiri srodna peptida koji su kodirani na plazmid pRJ6. Aureocin A53 je izrazito kationski peptid, bogat triptofanom, građen od 51 aminokiseline čiji se strukturni geni nalaze na plazmidu pRJ9 (Coelho i sur., 2007.).

Aureocini A53 i A70 pokazuju aktivno djelovanje prema *L.monocytogenes*. Aureocin A53 se, za razliku od drugih bakteriocina skupine II, sintetizira bez vodećeg peptida i zadržava formulirani N kraj. Posljedično tome, geni se za biosintetske enzime, imuno funkcije ili regulaciju biosinteze, ne mogu pronaći u blizini aureocina A53. Strukturni identitet aureocina A53 je verificiran Edmanovim sekvencioniranjem nakon deblokiranja s cijanogenim bromidom i opsežnim analizama masenom spektrometrijom enzimskih i laserom generiranih

fragmenata (Netz i sur., 2002.). Aureocin A53 se pročišćava do homogenosti hidrofobnim reakcijama, kationskom izmjenom i reverzno faznom kromatografijom. Jedinstvena svojstva koja izdvajaju aureocin A53 od drugih peptidnih bakteriocina uključuju izvanrednu proteaznu stabilnost i definiranu, krutu strukturu u vodenim otopinama (Netz i sur., 2002.).

Aureocin A70 je termostabilan bakteriocin i on, kao i njegovi drugi oblici su stafilocokni sa širokim spektrom djelovanja (Bastos i sur., 2009.) koje proizvodi većina gram-pozitivnih stafilocoknih sojeva (>70%) koji se povezuju s mastitisom kod krava u Argentini (Nascimento i sur., 2002.) ili u Brazilu (Ceotto i sur., 2009.). Ti peptidi imaju visok sadržaj malih aminokiselinskih ostataka poput glicina i alanina, ali bez cisteina. Analiza pročišćenih bakteriocinskih pripravaka masenom spektrometrijom dokazala je da sva četiri peptida kodirana *aurABCD* operonom su proizvedeni, ekspresionirani i izlučeni bez posttranslacijskih modifikacija. Dakle, aureocin A70 je multi-peptidni bakteriocin koji nije sličan lantibioticima i transportira se bez prerade (Netz i sur., 2001.). Coelho i sur. (2007.) su u svom radu dokazali djelotvornost oba aureocina u prevenciji i liječenju mastitisa, no puno bolju aktivnost pokazuju kada djeluju u sinergiji.



Slika 3.7. Prikaz aureocina A70 i A53

(Izvor: Bastos i sur. 2009.)

4. Bakteriocini u prevenciji i liječenju mastitisa

Globalni problem današnje intenzivne proizvodnje mlijeka je mastitis, najčešća i najskuplja bolest mliječnih životinja. Korištenje antibiotika u cilju liječenja mastitisa može dovesti do zaostanka antibiotskih rezidua u organizmu tretiranih krava ili prolaska antibiotika u sirovo mlijeko kroz mliječnu žlijezdu i krv. Rezidualni antibiotici osim što su opasni za ljudskog zdravlja, mogu uzrokovati probleme u preradi mlijeka u fermentirane mliječne proizvode poput jogurta, sira i sladoleda. Upravo se iz tog razloga kao i zbog pojave otpornosti bakterija na antibiotike javila potreba za otkrićem alternativnih metoda u prevenciji i liječenju mastitisa. Tako Nascimento i sur. (2004.) kao jednu od potencijalnih alternativnih antimikrobnih tvari navode korištenje bakteriocina.

Posljednjih desetljeća, predmetom istraživanja brojnih znanstvenika bilo je proučavanje svojstava različitih bakteriocina, njihove moguće uporabe, metoda izolacije odnosno identifikacija tipa bakteriocina. Razlog tome bila je činjenica da pokazuju izuzetan potencijal za uporabu u prehrambenoj industriji kao i za primjenu u medicini ili veterini za prevenciju i liječenje raznih zaraznih bolesti kod kojih se antibiotici nisu pokazali osobito uspješni.

Brojna provedena istraživanja dokazala su da određeni bakteriocini pozitivno djeluju kod mastitisa bilo kao samostalni ili u sinergiji s drugim bakteriocinima ili antibioticima ili nekim prethodno primjenjivanim sredstvima za prevenciju i liječenje mastitisa (Pieterse i Todorov, 2010.).

Bakteriocini su obično djelotvorni protiv specifičnih bakterijskih sojeva baziranih na ciljne receptore osjetljivih sojeva. Kod dijagnosticiranja mastitisa, bakterija koja je uzročnik mora biti identificirana te treba uzeti u obzir ciljani pristup za specifične patogene. Bakteriocini brzo ubijaju osjetljive organizme staničnom lizom. Takva brza reakcija osigurava da ne dođe do razvoja rezistencije kod patogena. Antibiotici koji se u tu svrhu koriste obično su širokog spektra djelovanja, odnosno djeluju na sve gram-pozitivne ili gram-negativne bakterije kojima su izloženi, a ne samo one koje uzrokuju infekciju. Bakteriocini nude prednost koristeći ciljano specifično djelovanje. U slučaju da je potreban širi spektar djelovanja, odnosno kako bi se osiguralo ciljanje više od jednog patogena, može se kombinirati dva ili tri bakteriocina istodobno. Potrebno je odrediti minimum inhibitorne koncentracije bakteriocina kako bi se smanjila količina upotrijebljenog bakteriocina u

tretmanskom proizvodu. Bakteriocin bi također trebao biti aktivan i postojan u ciljanom okolišu određeno vrijeme kako bi stigao doći u kontakt s potencijalnim patogenima (Pieterse i Todorov, 2010.).

Odrediti metode primjene lijeka u strategiji liječenja mastitisa vrlo je važno, a sredstvo za sisnu barijeru (uljna formulacija koja stvara fizičku barijeru protiv infekcija u području sisnog kanala i sinusa), nudi brojne prednosti. Prvenstveno djeluje kao fizička barijera i profilaksa. Kombinirajući antimikrobnu tvar u sredstvo za sisnu barijeru, lokalizira se inhibitor u sisnom kanalu te ciljaju patogeni koji mogu biti prisutni u blizini sisnog otvora i tako sprečavati kolonizaciju bakterija u tkivo vimena. Postojanost bakteriocina na površini kože sisa je esencijalna, ali ne smije uzrokovati iritacije ili alergijske reakcije kako se ne bi još više pogoršala upala sisnog područja. Bakteriocini koji su se pokazali najučinkovitijima u liječenju mastitisa su razni tipovi nizina, lakticina i aureocina (Pieterse i Todorov, 2010.). Nizin se koristi u komercijalnom proizvodu „Wipe-Out® Dairy Wipes“ kao dezinfekcijske maramice za sise u periodu laktacije, dok se lakticin 3147 primjenjuje u sredstvu za sisnu barijeru u razdoblju suhostaja. Bakteriocini koje proizvode BMK se smatraju sigurnim za zdravlje – GRAS (eng. *generally regarded as safe*) te su stoga puno prihvatljiviji za uporabu u usporedbi s antibioticima. Antibiotička terapija tijekom laktacije zahtjeva period povlačenja što rezultira ekonomskim gubicima. Rezidualni bakteriocin u mlijeku je prihvatljiviji jer probavni enzimi lako uništavaju peptide. Stoga, period povlačenja bi bio znatno kraći ako bi se koristila terapija bakteriocinima umjesto antibiotske terapije (Pieterse i Todorov, 2010.).

Sears i sur. (1992.) istraživali su uporabu germicidne formulacije za sprječavanje mastitisa kod mliječne stoke. Sredstva za sanitaciju sisa se rutinski koriste prije i poslije mužnje krava kako bi se spriječio prodor patogena u sisni kanal, uzročnika intramamarnih infekcija. U studiji su uspoređivali formulaciju na bazi nizina (Ambicin N®) s konvencionalnim kemijskim tretmanima kao što su jodofor i kloroheksidin. Inicijalni podaci pokazali su znatno smanjenje patogena na površini tretiranog dijela sisa nakon jedne minute izlaganja germicidnoj formulaciji (tablica 4.1.). Pored toga, germicidna je formulacija pokazala mali potencijal za iritaciju kože sisa nakon ponavljanog izlaganja u usporedbi s 1%-tnim jodoforom i 5%-tnim kloroheksidin diglukonatom (tablica 4.2.).

Tablica 4.1. Podaci performansa za germicidno sredstvo za sanitaciju sisa na bazi nizina

Bakterije uzročnici mastitisa	Redukcija korištenjem Ambicin N®
<i>S. aureus</i>	61,8%
<i>S. agalactiae</i>	98,6%
<i>E. coli</i>	85,5%
<i>S. uberis</i>	67,1%
<i>K. pneumonia</i>	76,5%

(Izvor: Prilagođeno prema Sears i sur. 1992.)

Tablica 4.2. Usporedba iritacije kože s kožom zeca nakon izlaganja sredstvu za sanitaciju sisa

Sredstvo za sanitaciju sisa	Rezultati dermalne iritacije	
	Jedna primjena (72 h nakon primjene)	Višestruka primjena (72 h nakon zadnje 7-dnevne primjene)
Ambicin N®, 1xkoncentracija	0,21	0,30
Ambicin N®, 12xkoncentracija	0,09	0,04
1%-tni jodofor	0,5	3,34
5%-tni kloroheksidin diglukanat	0,38	2,34

(Izvor: Prilagođeno prema Sears i sur. 1992.)

Rezultati dermalne iritacije manji od 1,0 indiciraju da se radi o proizvodu s malim potencijalom ili bez potencijala za uzrokovanje iritacija, dok proizvodi koji rangiraju od 3,0-4,9 imaju potencijal za uzrokovanje ozbiljne iritacije. Kemijska sredstva za sanitaciju sisa mogu predstavljati ozbiljan problem ako se u potpunosti prije mužnje ne uklone. Prednost pred njima imaju proizvodi koji sadrže bakteriocine jer ih zbog svojstava nije potrebno potpuno odstraniti. Uz Ambicin N®, koriste se još dva proizvoda na bazi nizina, „Wipe-Out® Dairy Wipes“ i „Mast Out®“ (Pieterse i Todorov, 2010.).

Castelani i sur. (2019.) u svom su radu ocjenjivali bakteriocidnu aktivnost nizina samostalno primijenjenog i u sinergiji s kationskim lipidom dioktadecildimetilamonij bromidom (DDA) protiv antibiotik rezistentnog *Staphylococcus* spp. izoliranog iz mlijeka

krava oboljelih od mastitisa. Utvrdili su da, iako i samostalno pokazuju antimikrobno djelovanje, u sinergiji je njegov učinak veći. Također, poznato je da kombinacija antimikrobnih spojeva može spriječiti razvoj rezistencije, smanjujući nuspojave. S druge strane, još je jedna prednost kombiniranja dva lijeka, a to je širenje spektra djelovanja. Tako je i ovim istraživanjem dokazano da iako nizin generalno djeluje protiv gram-pozitivnih bakterija, u kombinaciji s konvencionalnim antibioticima, povećava antimikrobno djelovanje. Son i sur. (2016.) navode nekoliko istraživanja o učinkovitosti bakteriocina u liječenju mastitisa uz činjenicu da je njihov učinak ograničen zbog njihove aktivnosti samo u području niskog pH.

Wu i sur. (2007.) su istraživali djelovanje nizina Z na liječenje subkliničkog mastitisa kod krava u laktaciji. Devedeset Holštajn krava sa subkliničkim mastitisom, slučajnim odabirom podijelili su u dvije grupe, grupu koju su tretirali nizinom Z te kontrolnu grupu. U pokusnoj grupi, krave su dobivale intramamarnu infuziju nizina u dozi od 2,500,000 IU jednom dnevno kroz tri dana dok krave u kontrolnoj grupi nisu bile tretirane nikakvim lijekom. Uzorci mlijeka uzimani su iz zaraženih četvrti prije tretmana te 1-2 tjedna nakon tretmana za analizu broja i vrsta bakterija, somatskih stanica i N-acetil- β -D-glukozaminidaze (NAG-aze). Nizinska terapije imala je 90,1%-tnu stopu izlječenja za *S. agalactiae*, 50%-tnu za *S. aureus*, 58,8%-tnu za koagulaza negativne stafilokoke te 65,2%-tnu za sve slučajeve ukupno, dok je samo 15,9% netretiranih krava spontano ozdravilo. Aktivnost NAG-aze u uzorcima mlijeka i pojavnost četvrti vimena s brojem somatskih stanica većim od 500,000/ml su znatno smanjeni nakon tretmana nizinom Z, dok u kontrolnoj grupi nije bilo značajnih promjena. Također, utvrdili su značajnost utjecaja koncentracije nizina budući da pri koncentraciji nizina od 2,500,00 IU nije došlo do nikakvih iritacija, dok su pri koncentraciji od 5,000,000 IU primijećene iritacije i vizualne promjene u mlijeku i četvrtima vimena. Prisutnost nizina, već nakon 48h, bila je manja od dopuštene granice od 500 mg/ml te su na temelju tih rezultata kineske vlasti dozvolile uporabu nizina kao biokonzervansa u mlijeku.

U prevenciji i liječenju mastitisa koristi se i lakticin 3147 kojeg proizvodi *L.lactis ssp.lactis* koji je kao i nizin klasificiran u la skupinu lantibiotika, ali se razlikuje od nizina po tome što je on dipeptidni lantibiotik koji za svoju potpunu aktivnost zahtjeva prisutnost oba peptida, LtnA1 i LtnA2. Lakticin 3147 ima širok spektar antimikrobnog djelovanja te inhibira rast bakterija kao što su *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus pentriceans*, *S.aureus*, *S.thermophilus*, *Clostridium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus* spp. i većinu

streptokoka koji uzrokuju mastitis. Postao je predmetom istraživanja jer je uočen njegov inhibitorni učinak na patogene bakterije uzročnike mastitisa: *Streptococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* i *Streptococcus dysgalactiae*. Za njega je karakteristična aktivnost kod niskog i fiziološkog pH te je termostabilan (Ryan i sur., 1998.; Pieterse i Todorov, 2010.). Djelovanje mu je dvojako: predstavlja fizičku barijeru protiv infekcije u području sisa te inhibira sve gram-pozitivne bakterije koje lako prodiru u područje sisnog kanala. Ryan i sur. (1998.) u svom su istraživanju pratili učinak lakticina 3147 u sredstvu za sisnu barijeru. Inicijalna istraživanja upućivala su na to da bakteriocin proizveden u mediju sintetskog rasta nije adekvatno otpušten iz barijerne formulacije bez dodatka surfaktanta (Tween 80). Rezultatima daljnjih istraživanja poboljšala se učinkovitost barijernog sredstva s lakticinom 3147, ali ako se nalazi u mediju na bazi mlijeka (sirutka). Porast aktivnosti takvog baktericidnog pripravka rezultirala je znatnim otpuštanjem peptida u barijernu formulaciju i bez dodatka Tween 80 što je predstavljalo jeftiniju metodu proizvodnje veće količine bakteriocina. U konačnici, istraživanjem je dokazan izniman potencijal lakticina 3147 u sredstvima za sisnu barijeru i njegov djelotvoran učinak u sprječavanju pojave novih infekcija.

Twomey i sur. (2000.) ispitivali su djelovanje sisnog barijernog sredstva s lakticinom 3147, s netretiranim četvrtima kao kontrolom protiv izazovne *S. aureus*. Koncentracija bakteriocina i inokuluma *S. aureus* je bila varijabilna kako bi se optimizirali uvjeti. Prisutnost barijernog sredstva s lakticinom 3147 pri koncentraciji od 32768 AU/4 g barijernog sredstva rezultirala je 86,2%-tnu izlječenost tretiranih sisa (tablica 4.4.). Međutim, antagonistički učinak bakteriocina pri istoj koncentraciji, a povećanoj inokulaciji *S. aureus* u sise krava je smanjen, što ukazuje da je koncentracija bakteriocina važan faktor kod utvrđivanja učinkovitosti izlječenja sisa inficiranih patogenom bakterijom *S. aureus*.

Tablica 4.4. Djelovanje barijernog sredstva s lakticinom 3147 u eliminaciji *S. aureus* kod umjetno inficiranih krava nakon 18h

Inokulum	Lakticin 3147 AU/4g barijernog sredstva	Tretman	Ukupno inokuliranih sisu	Broj sisa oslobođenih od <i>S. aureus</i>	% uspješno tretiranih sisu
1,7x10 ³	32 768	Netretirane	29	19	34,5
		Barijerno sredstvo +lakticin 3147	29	4	86,2
6,8x10 ³	32 768	Netretirane	20	16	20,0
		Barijerno sredstvo +lakticin 3147	20	11	45,0

(Izvor: Prilagođeno prema Twomey i sur., 2000.)

Formulacija sisne barijere kao „Orbeseal®“ se preporuča za korištenje u periodu suhostaja te kao profilaksa kako bi se smanjio broj novih infekcija. Antibiotici poput kloxacilina se dodaju formulaciji („Oberrin dry cow“) za prevenciju novih infekcija u tom razdoblju. Međutim, dulja izloženost antibioticima čak i u niskim dozama može povećati rizik od pojave rezistencije kod patogenih bakterija uzročnika mastitisa. Bakteriocini poput lakticina 3147 mogu zamijeniti antibiotike u tim formulacijama jer niti jedna studija još nije dokazala rezistenciju kod patogena uzročnika mastitisa na lakticin 3147 (Pieterse i Todorov, 2010.). Tako je istraživana utjecaj formulacije sisne barijere na bazi bizmut subnitrata („Osmonds Teat seal 2“) u kombinaciji s lakticinom 3147 na patogene bakterije *S. dysgalactiae* i *S. aureus*. Praćena je pojava iritacije na tretiranom sisnom području i broj somatskih stanica u mlijeku. Također, uspoređivali su u konačnici i zaštitu koju je pružila sama formulacija sisne barijere i ona kojoj je dodan lakticin 3147. Rezultati su ukazali na značajnu zaštitnu ulogu sredstva s lakticinom 3147 jer se u 91% četvrti vimena, tretiranih

barijerom s lakticinom 3147, nije pojavila nova infekcija u usporedbi sa 33,3% četvrti tretiranih s barijernim sredstvom bez lakticina (tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Klinički mastitis i oporavak od *S. dysgalactiae* kod nekliničkog mastitisa u četvrtima nakon tretmana s čistim barijernim sredstvom i barijernim sredstvom s dodatkom lakticina 3147

Tretman	Broj tretiranih četvrti	Nove kliničke infekcije uzrokovane <i>S. dysgalactiae</i>	Nove nekliničke izolacije <i>S. dysgalactiae</i>
Barijerno sredstvo	33	16 (48,5%)	6(18,2%)
Barijerno sredstvo + lakticin 3147	35	3(8,6%)	0(0%)

(Izvor: Prilagođeno prema Pieterse i Todorov 2010.)

Od svih bakteriocina koje proizvodi *S. aureus*, najbolje su okarakterizirani aureocini A70 i A53. Aureocin A70 je multi peptid, bakteriocin nesličan lantibioticima kojeg proizvodi soj *S.aureus* A70. Aureocin A70 je prvi opisan aureocin koji se sastoji od 4 srodna mala peptida koji su kodirani na operon aurABCD. Aureocin A53 je peptid građen od 51 aminokiseline, a proizvodi ga soj *S. aureus* A53. Kao i druge antimikrobne tvari koje proizvode stafilokoki, stafilokokcini se mogu koristiti u svom pročišćenom obliku u kontroli mastitisa (Nascimento i sur., 2004.). Većina stafilokokcina su ili lantibiotici (Pep5, epicidin 280, epidermin, epilancin K7, nukacin ISK-1 i C55/BacR1) ili pripadaju drugoj skupini bakteriocina (aureocini A70 i A53). Stafilokokcini mogu inhibirati mnoge bakterijske vrste uključujući i neke patogene te stoga imaju praktičnu primjenu kao alternativa antibioticima ili kao biokonzervansi u prehrambenoj industriji (Ceotto i sur., 2009.).

Coelho i sur. (2007.) istraživali su osjetljivost nekoliko stafilokoknih i streptokoknih sojeva uzročnika mastitisa na sedam različitih stafilokokcina odnosno inhibitorno djelovanje tih bakteriocina prema navedenim patogenima (tablica 4.5.). Sličnom problematikom bavili su se i Ceotto i sur. (2009) koji su uspoređivali osjetljivost 65 sojeva *S.aureus* u Argentini i 165 izoliranih sojeva u Brazilu kao i 74 soja *S. agalactiae* na osam aureocina. Povrh toga u istraživanje su bila uključena i četiri lantibiotika iz *S. epidermis* zbog njihovog šireg spektra aktivnosti.

Tablica 4.5. Stafilokokni sojevi koji proizvode bakteriocine i njihovi derivati

Sojevi	Plazmidi i bitne značajke	Bakteriocini
<i>S. aureus</i>		
A70	pRJ6	Aureocin A70
A53	pRJ9	Aureocin A70
MB50	pRJ6 i pRJ22	Aureocini A70+A53
215FN	pRJ35	Aureocin 215FN
<i>S. epidermis</i>		
Tü3298	Tü3298	Epidermin
K7	/	Epilancin K7
BN280	pCR01	Epicidin 280
5	pED503	Pep5

(Izvor: Prilagođeno prema Coelho i sur., 2007.)

Od 74 izolirana soja *S. agalactiae*, njih 72 (97,3%) inhibirani su epiderminom. Dva soja koja nisu inhibirana epiderminom, bila su osjetljiva na kombinaciju aureocina A53 i A70 (tablica 4.6.). Ceotto i sur. (2012.) analizirali su u svom radu genetsku vezu između 46 sojeva *S. aureus* izoliranih u Brazilu iz 12 geografski udaljenih mliječnih stada, uključujući 34 izolata koji proizvode aureocin A70. Zaključuju da usko srodni stafilokokni sojevi mogu proizvesti različite stafilokokcine.

Iako je znatan broj bakteriocina opisan i istražen, ne pokazuju svi istu učinkovitost. Aureocin A70 i A53 te epidermin pokazali su najznačajniji potencijal u prevenciji i liječenju mastitisa.

Tablica 4.6. Aktivnost stafilokokcina u odnosu na aktivnosti testiranih indikatorskih sojeva

Bakteriocini (sami ili u kombinaciji)	Testirani indikatorski sojevi i postotak inhibicije		
	<i>S. agalactiae</i> (74 soja)	Brazilski <i>S. aureus</i> (117 sojeva)	Argentinski <i>S. aureus</i> (48 sojeva)
Aureocin A70	1,4	26,5	16,0
Aureocin A53	67,6	74,4	100
Aureocini A70 + A53	91,9	91,5	100
Aureocin 215FN	47,3	38,5	8,0
Epacidin 280	13,5	0	0
Epilancin K7	0	0	0
Epidermin	97,3	87,2	85,4
Pep5	0	52,1	93,8

(Izvor:Prilagođeno prema Coelho i sur., 2007.)

5. Zaključak

Uzimajući u obzir opsežne troškove liječenja mastitisa kao i posljedice koje donosi primjena antibiotika u njegovom liječenju, istraživanja usmjerena ka pronalasku održivih i sigurnih alternativnih lijekova ili antimikrobnih tvari treba svakako razmotriti. Bakteriocini se, u tom smislu, mogu smatrati pravim tretmanskim rješenjem. U budućnosti bi se trebalo posvetiti istraživanju bakteriocina i njihovog djelovanja, ali isto tako iskoristiti njihov potencijal u prevenciju i liječenje mastitisa osobito kada antibiotici nisu djelotvorni. U tom smislu, najveći potencijal imaju razni oblici nizina, lakticina i aureocina.

6. Literatura

1. Askaa G., Ernø H. (1976). Evaluation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to species rank *Mycoplasma bovis* (Hale et. Al.) comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol, 26: 323-325.
2. Bačić G. (2009). Dijagnostika i liječenje mastitisa u goveda. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
3. Bastos M. C. F., Coelho M. L. V., Santos O. C. S. (2015). Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. Microbiology. 161: 683-700.
4. Bastos M. C. F., Ceotto H., Coelho M.L.V., Nascimento J. S. (2009). Staphylococcal Antimicrobial Peptides: Relevant Properties and Potential Biotechnological Applications. Current Pharmaceutical Biotechnology, Volume 10, Number 1, pp. 38-61(24).
5. Castelani L., Arcaro J. R. P., Braga J. E. P., Bosso A. S., Moura Q., Esposito F., Sauter I. P., Cortez M., Lincopan N. (2019.) Activity of nisin, lipid bilayer fragments and cationic nisin-lipid nanoparticles against multidrug-resistant *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis. J. Dairy Sci. 102:1–6 <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15171>.
6. Ceotto H., Dias R. C. S., Nascimento J.S., Paiva Brito M. A. V., Giambiagi-deMarval M., Bastos M. C. F. (2012). Aureocin A70 production is disseminated amongst genetically unrelated *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. Letters in Applied Microbiology ISSN 0266-8254, doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03226.x.
7. Ceotto H., Nascimento J. S., Paiva Brito M. A. V., Bastos M. C. F. (2009). Bacteriocin production by *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis in Brazil. Res Microbiol 160, 592–599.
8. Coelho M. L. V., Nascimento J.S., Fagundes P. C., Madureira D. J., Oliveira S. S., Paiva Brito M. A. V. , Bastos M. C. V. (2007). Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. Microbiology 158, 625-630.
9. Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology 3: 777-788.

10. Cuellar Lopez M. R., Rodríguez-Hernández A. I., Chavarría-Hernández N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30:6, 1039-1050. DOI: 10.1080/13102818.2016.1232605.
11. Cvetnić L., Benić M., Habrun B., Kompes G., Stepanić M., Samardžija M. (2016). Najčešći uzročnici mastitisa u krava i koza u Republici Hrvatskoj. Prenešeno iz časopisa *Veterinarska stanica* broj 47. [online] <<https://veterina.com.hr/?p=52958>>. Pristup: 30. siječnja 2019.
12. Čačić Z., Kalit S., Antunac N., Čačić M. (2003). Somatske stanice i čimbenici koji utječu na njihov broj u mlijeku. *Stručni rad. Mljekarstvo*. 1: 23-36
13. De Vuyst L., Leroy F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13: 194-199.
14. Drider D., Fimland G., Hechard Y., McMullen L. M., Prevost H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 564–582.
15. Fujita K., Ichimasa S., Zendo T., Koga S., Yoneyama F., Nakayama J., Sonomoto K. (2007). Structural Analysis and Characterization of Lacticin Q, a Novel Bacteriocin Belonging to a New Family of Unmodified Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(9): 2871–2877, <https://dx.doi.org/10.1128%2FAEM.02286-06>
16. Giesecke W. H., Du Preez J. H., Petzer I. M. (1994). *Practical Mastitis Control in Dairy Herds*. Butterworth Publishers. Durban, South Africa.
17. Gillor O., Nigro L.M., Riley M. A. (2005). Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next Generation of Antimicrobials. *Curr. Pharm. Des.*, 11: 1067-1075.
18. Habrun B., Kompes G., Kiš T., Lohman Janković I. (2015). Antimikrobna rezistencija u veterinarskoj medicini: nastanak i značaj. Predavanja s kongresa veterinarska znanost i struka. [online] <<http://veterina.com.hr/?p=47937>>. Pristup: 15. svibnja 2019.
19. Havranek J., Rupiće V. (2003). *Mlijeko od farme do mljekare*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

20. Imran S. (2016). Bacteriocin: An Alternative to Antibiotics. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 5(11): 467-477.
21. Jurmanović J., Bačanek B., Pavljak I., Sukalić T., Jaki V., Majnarić D., Končurat A., Sokolović J. (2012). Susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine intramammary infections to different antimicrobial agents. *Medical Sciences*. 37: 105-111.
22. Kalenić S. (2000). Antimikrobno liječenje. Rezistencija bakterija na antibiotike. *Medicus*. 149-153.
23. Kalmus P., Aasmäe B., Kärssin A., Orro T., Kask K. (2011). Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 4: 1-7.
24. Kelly A. L., (2002). Test methods and standards. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press. 3: 1995–2002.
25. Kostelić A. (2015). Mastitis – najskuplja bolest. *Mljekarski list*. 08: 16-17.
26. Leroy F., De Vuyst L. (2010). Bacteriocins of lactic acid bacteria to combat undesirable bacteria in dairy products. *Australian Journal of Dairy Technology*. 65(3): 143-149.
27. Leskovec P., Bendelja Ljoljić D., Benić M., Kostelić A., Cvetnić Ž., Antunac N. (2015). Uzročnici mastitisa i antimikrobne tvari. Osjetljivost izdvojenih uzročnika mastitisa prema antimikrobnim tvarima. *Mljekarstvo*. 3: 149-158.
28. Liu W., Chan A. S. H., Liu H., Cochrane S. A., Vederas J. C. (2011). Solid Supported Chemical Synthesis of Both Components of the Lantibiotic Lacticin 3147. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 14216.
29. Maćešić N. (2010). Učinkovitost pojedinih metoda zasušivanja krava. Disertacija. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
30. Nandane A. S., Tapre A.R., Ranveer R. C. (2007). Applications of bacteriocins as bio-preservative in foods: a review. *ADIT J of Engg*. 4(1): 50-55.
31. Nascimento J. S., Fagundes P. C., Paiva Brito M. A. V., Santos K. R. N., Bastos M. C. V. (2004). Production of bacteriocins by coagulase-negative staphylococci involved in bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* 106, 61–71.
32. Nascimento J. S., Santos K. R. N., Gentilini E., Sordelli D., Bastos M. C. F. (2002). Phenotypic and genetic characterization of bacteriocin producing strains of *Staphylococcus aureus* involved in bovine mastitis. *Vet Microbiol* 85, 133–144.

33. Netz D. J., Bastos M. C. F., Sahl H. G. (2002). Mode of Action of the Antimicrobial Peptide Aureocin A53 from *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 68(11): 5274–5280. doi:10.1128/AEM.68.11.5274-5280.
34. Netz D. J., Pohl R., Beck-Sickinger A. G., Selmer T., Pierik A. J., Bastos M. C. F., Sahl H. G. (2002). Biochemical characterisation and genetic analysis of aureocin A53, a new, atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 319(3):745-56. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00368-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00368-6).
35. Netz D. J., Sahl H. G., Marcelino R, Nascimento J. D. S., de Oliveira S. S., Soares M. B., Bastos M. C. F. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. *J.Mol.Biol.* 311(5): 939-49. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4885>.
36. Pavlak M., Benić M., Cvitković D., Tadić M. (2008). Epidemiological data of intramammary infection in cattle – a quantitative analysis of published data. XVI. kongres Mediteranske federacije za zdravlje i produktivnost preživača. Zadar. Zbornik radova, 97-112.
37. Perez R. H., Zendo T., Sonomoto K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories.* 13(1): S3, 1-13. doi: 10.1186/1475-2859-13-S1-S3.
38. Pieterse R., Todorov S. D. (2010). Bacteriocins – exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 542-562.
39. Radostis O. M., Gay C. C., Blood D. C., Hinchliffk W. (2000). *Veterinary medicine. Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.* 9 th ed. 2000.
40. Ramith R., Prithvi S. S., Aishwarya T. D., Ashwini P., Kumuda J., Lochana M. S., Zameer F., Dhananjaya B. L., Nagendra P. M. N. (2015). Bacteriocins and Their Applications in Food Preservation, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2015.1020918.
41. Ryan M. P., Meaney W. J., Ross R. P., Hill C. (1998). Evaluation of Lacticin 3147 and a Teat Seal Containing This Bacteriocin for Inhibition of Mastitis Pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2287-2290.
42. Samaržija D. (2015). Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

43. Samaržija D. (2017). Mljekarska mikrobiologija III dio. Patogeni mikroorganizmi povezani s mlijekom i mliječnim proizvodima (radna verzija teksta). Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
44. Sears P. M., Wilson D.J., Gonzalez R.N. (1992). The potential role of antimicrobial proteins in the treatment of bovine mastitis, p. 138–142. *In* Proceedings of the XVIIIth World Buiatrics Congress and the XXVth American Association of Bovine Practitioners Conference, vol. 2.
45. Silva C. C. G., Silva S. P. M., Ribeiro S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*. 9(594): 1-15. doi: 10.3389/fmicb.2018.00594.
46. Son S. J., Park M. R., Ryu S. D., Maburutse B. E., Oh N. S., Park J., Oh S., Kim Y. (2016). In vivo screening platform for bacteriocins using *Caenorhabditis elegans* to control mastitis-causing pathogens. *J. Dairy Sci.* 99:1–8.
47. Šeol B., Matanović K., Terzić S. (2010). Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Medicinska naklada. Zagreb. 45-49.
48. Šeol B., Naglić T., Sokolić K. (2005). Mikoplazmoza vimena u krava uzrokovana vrstom *Mycoplasma bovis*. *Veterinarska stanica*. 36: 25-30.
49. Štoković I., Kostelić A., Benić M., Matković K. (2014). Novi način borbe protiv mastitisa na farmama mliječnih krava. Veterinarski fakultet i Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Hrvatski veterinarski institut.
50. Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S. (2010). Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology* 48 (3): 296-307.
51. Twomey D. P., Wheelcock A. I., Flynn J., Meaney W. J., Hill C., Ross R. P. (2000). Protection against *Staphylococcus aureus* Mastitis in Dairy Cows Using a Bismuth-Based Teat Seal Containing the Bacteriocin, Lacticin 3147. *J. Dairy Sci.*, 83: 1981-1988.
52. Vesković Moračanin S. M., Đukić A., Memiši N. R. (2014). Bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria. BIBLID: 1450-7188, 271-283. DOI: 10.2298/APT1445271V.
53. Villa T. G., Feijoo-Siota L., Rama J. L. R., Sánchez-Pérez A., Miguel-Bouzas (2016). The Case of Lipid II: The Achilles' Heel of Bacteria. U: *New Weapons to Control Bacterial Growth*. Springer, Switzerland. 185-218.

54. Wu J., Hu S., Cao L. (2007). Therapeutic Effect of Nisin Z on Subclinical Mastitis in Lactating Cows. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. p. 3131–3135. doi:10.1128/AAC.00629-07.
55. Zacharof M. P., Lovitt R. W. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *APCBEE Procedia*. 2:50-56.
56. Zendo T. (2013). Screening and Characterization of Novel Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 77(5): 893-899.
57. Zou J., Jiang H., Cheng H., Fang J., Huang G. (2018). Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. *Biomac*, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.23

Životopis

Andreja (rođ. Kopačević) Grgić rođena je 26. svibnja 1993. godine u Zagrebu.

Pohađala je Opću gimnaziju u srednjoj školi Pere Zečevića u Odžaku (BiH) u razdoblju od 2008. do 2012. godine.

Upisala se na Veleučilište u Požegi 2012. godine na preddiplomski stručni studij na Poljoprivrednom odjelu, smjer Prehrambena tehnologija, te završila u rujnu 2016. godine.

U razdoblju od ožujka 2017. godine do rujna 2017. godine radila u MUP – u Županije Posavske na odjelu Osobnih iskaznica u Odžaku.

Na Agronomski fakultet u Zagrebu, smjer Proizvodnja i prerada mlijeka upisala se u rujnu 2017. godine.

Poznaje rad na računalu, engleski jezik A2 razina i njemački jezik A1 razina, vozačka dozvola B kategorije.